

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR IMMUNOLOGIE  
PROF. DR. DANIELA N. MÄNNEL  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

---

**VERSUCH DER HERSTELLUNG EINES  
MONOKLONALEN MAUS-ANTI-MAUS-ANTIKÖRPERS  
GEGEN DEN TNFR2 MIT AGONISTISCHEN ODER  
ANTAGONISTISCHEN EIGENSCHAFTEN**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von  
Diana Silvia Minge**

**2011**



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR IMMUNOLOGIE  
PROF. DR. DANIELA N. MÄNNEL  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

---

**VERSUCH DER HERSTELLUNG EINES  
MONOKLONALEN MAUS-ANTI-MAUS-ANTIKÖRPERS  
GEGEN DEN TNFR2 MIT AGONISTISCHEN ODER  
ANTAGONISTISCHEN EIGENSCHAFTEN**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von  
Diana Silvia Minge**

**2011**

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

Prof. Dr. Daniela Männel

Prof. Dr. Bernd Salzberger

13. April 2012

---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Antikörper .....	1
1.1.1 Struktur von Antikörpern .....	1
1.1.2 Funktionen und Aufgaben von Antikörpern .....	4
1.1.3 Herstellung monoklonaler Antikörper .....	6
1.1.4 Anwendung monoklonaler Antikörper.....	7
1.2 Tumor Nekrose Faktor .....	9
1.2.1 Die TNF –Rezeptoren .....	10
1.2.1.1 Die Signaltransduktion des TNFR1 .....	12
1.2.1.2 Die Signaltransduktion des TNFR2 .....	13
1.2.2 Therapeutische Möglichkeiten im TNF/TNFR-System.....	14
1.2.2.1 TNF-Therapie .....	14
1.2.2.2 Anti-TNF-Therapie .....	15
1.3 Zielstellung der Arbeit .....	19
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
2.1 Material .....	21
2.1.1 Geräte .....	21
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	22
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	23
2.1.4 Lösungen, Puffer und Medien .....	24
2.1.5 Antikörper .....	26
2.1.6 Zelllinien .....	27
2.1.7 Rekombinante Rezeptorproteine .....	28
2.1.8 Tiere .....	29
2.2 Methoden.....	29
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	29
2.2.1.1 Zellkulturbedingungen .....	29
2.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen .....	30
2.2.1.3 Kultivierung adhärenter Zellen .....	30
2.2.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl.....	30
2.2.1.5 Präparation von Zellsuspensionen aus Milzgewebe .....	30

---

2.2.1.6	Präparation von Zellsuspensionen aus Thymusgewebe.....	31
2.2.1.7	Stimulation von T-Zellen .....	31
2.2.2	Herstellung monoklonaler m- $\alpha$ -mTNFR2-Antikörper .....	32
2.2.2.1	Überblick über die Hybridomatechnik.....	32
2.2.2.2	Immunisierung der Mäuse .....	34
2.2.2.3	Gewinnung und Aufbereitung der Mäuseseren zur Titerbestimmung.....	34
2.2.2.4	Kultivierung der Myelomazellen für die Fusion.....	34
2.2.2.5	Gewinnung von Peritonealexudatzellen (PEC) .....	35
2.2.2.6	Isolierung der Milzzellen für die Zellfusion .....	35
2.2.2.7	Zellfusion .....	35
2.2.2.8	Kultivierung von Hybridomazellen und Subklonierung.....	36
2.2.2.9	Herstellung der Hybridomaüberstände .....	37
2.2.2.10	Aufreinigung der Antikörper mittels Protein G Sepharose-Säule .....	37
2.2.2.11	Subklassentest des monoklonalen Antikörpers.....	38
2.2.3	Der „Enzyme-linked Immunosorbent-Assay“ .....	38
2.2.3.1	Überblick über das ELISA-Verfahren .....	38
2.2.3.2	Herstellung der mit dem mTNFR2-Protein beschichteten ELISA-Platten.	39
2.2.3.3	ELISA zur Bestimmung der Immunglobulintiter der Mäuseseren .....	40
2.2.3.4	ELISA zur Testung der Hybridomaüberstände auf eine spezifische Antikörperproduktion.....	40
2.2.4	Proteinchemische Methoden .....	41
2.2.4.1	Dot-Blot-Verfahren und Proteindetektion .....	41
2.2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	41
2.2.4.3	Coomassie-Färbung .....	42
2.2.4.4	Western Blot-Verfahren.....	43
2.2.5	TNF-Bioassays zur funktionellen Charakterisierung des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak ....	44
2.2.5.1	Testung kreuzreaktiver Eigenschaften im TNF-induzierten Zytotoxizitätsassay .....	44
2.2.5.2	Testung hemmender Eigenschaften im TNF-induzierten Zytotoxizitätsassay .....	46
2.2.5.3	Testung aktivierender und hemmender Eigenschaften im Bioassay mit der cytotoxischen CT-6-Zelllinie .....	48
2.2.6	Durchflusszytometrie .....	50
2.2.6.1	Allgemeines Prinzip der FACS-Analyse .....	50

---

2.2.6.2	Untersuchung der Antikörperbindung an den mTNFR2 transfizierter CHO-Zellen .....	51
2.2.6.3	Untersuchung der Antikörperbindung an den mTNFR2 der Milzzellen ....	52
2.2.6.4	Untersuchung der Antikörperbindung an den mTNFR2 der Thymozyten .	53
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
3.1	Herstellung monoklonaler Antikörper .....	54
3.1.1	Immunisierung von mTNFR2 <sup>-/-</sup> Mäusen .....	54
3.1.2	Zellfusion .....	55
3.1.3	Antikörperproduktion und Testung im ELISA .....	56
3.1.4	Bestimmung der Immunglobulin-Subklasse .....	58
3.2	Charakterisierung des m- $\alpha$ -mTNFR2-Antikörpers .....	59
3.2.1	Spezifitätsnachweis im Dot Blot .....	59
3.2.2	Spezifitätsnachweis im Western Blot.....	60
3.2.3	Kreuzreaktivitätstestung im TNF-induzierten Zytotoxizitätstest.....	63
3.2.4	Testung hemmender Eigenschaften im TNF-induzierten Zytotoxizitätstest.....	65
3.2.5	Testung blockierende und aktivierende Eigenschaften im Bioassay mit der cytotoxischen CT-6-Zelllinie .....	68
3.2.6	Durchflusszytometrische Bindungsanalyse des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak an den mTNFR2 transfizierter CHO-Zellen .....	69
3.2.7	Durchflusszytometrische Bindungsanalyse an die T-Zellen aus Milz und Thymus der Maus.....	72
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>74</b>
4.1	Herstellung monoklonaler Antikörper gegen den mTNFR2.....	74
4.2	Spezifitätstestung im ELISA-, Dot Blot- und Western Blot-Verfahren.....	76
4.3	Durchflusszytometrische Analyse einer Antikörperbindung an den mTNFR2 transfizierter CHO-Zellen .....	77
4.4	Durchflusszytometrische Analyse einer Antikörperbindung an den mTNFR2 stimulierter T-Zellen aus Milz und Thymus der Maus .....	78
4.5	Kreuzreaktivität.....	82
4.6	Aktivierung des mTNFR2 .....	82
4.7	Blockierung des mTNFR2 .....	84
4.8	Mögliche Einsatzgebiete des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak in Forschung und Diagnostik.....	85
4.9	Der TNFR2 als therapeutische Zielstruktur in der Medizin.....	87
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>89</b>

---

<b>6</b>	<b>Literturverzeichnis.....</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>106</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>108</b>
<b>9</b>	<b>Formelverzeichnis .....</b>	<b>108</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>109</b>
<b>11</b>	<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>110</b>



**Abkürzungsverzeichnis**

$\alpha$ -	anti oder alpha
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserum-Albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDR	<i>Complementarity Determing Regions</i>
CFA	<i>Complete Freund`s Adjuvant</i>
CHO-Zellen	<i>Chinese Hamster Ovarial</i> –Zellen
DD	<i>Death Domain</i> (Todesdomäne)
dem. H <sub>2</sub> O	demineralisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DS-2	Drosophila-Schneider 2-Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent-Assay</i>
ECD	<i>Extracellular Domain</i> (extrazelluläre Domäne)
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoreszein isothiocyanat (Fluorochrom)
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
h	Stunde oder human
HRP	<i>Horseraddish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HAT-Medium	Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin-Medium
hTNF	Human-TNF
IFA	<i>Incomplete Freund`s Adjuvant</i>
IgG	Immunglobulin der Gruppe G
I $\kappa$ B	<i>Inhibitory <math>\kappa</math>B</i>
I $\kappa$ K	<i>Inhibitory <math>\kappa</math>B kinase</i>
IL	Interleukin

---

i.p.	Intraperitoneal
JNK	<i>c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase</i>
Kap.	Kapitel
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
L-929	Maus- Fibrosarkomzelllinie
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lymphotoxin
m	murin oder milli (10 <sup>-3</sup> ) oder Meter
M	Molar
mAK	Monoklonaler Antikörper
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak	Maus- $\alpha$ -Maus-TNF-Rezeptor Typ 2-Antikörper
mem.	<i>membrane-bound</i> (membrangebunden)
min	Minuten
mTNF	Maus-TNF
mTNFR2	Maus-TNF-Rezeptor Typ 2
mTNFR2-V5-His	mTNFR2-(ECD) -V5-His
mTNFR2-IgG	mTNFR2-(ECD) -IgG-(Fc)
$\mu$	mikro (10 <sup>-6</sup> )
n	nano (10 <sup>-9</sup> )
NaCl	Natriumchlorid
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
OD	<i>optical density</i>
p	piko (10 <sup>-12</sup> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PE	Phycoerythrin
PEC	<i>Peritoneal Exudat Cells</i>
Pen/Strep-Lösung	Penicillin-Streptomycin-Lösung
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
POX	Peroxidase
RIP	<i>Receptor Interacting Protein</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>

---

RT	Raumtemperatur
s	<i>soluble</i> (löslich)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i>
SODD	<i>Silencer of Death Domain</i>
SSC	<i>Sideward scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
Tab.	Tabelle
TACE	<i>TNF-alpha converting enzyme</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with 0,5% (v/v) Triton-X 100</i>
TCR	<i>T-cell-receptor</i> ( T-Zell-Rezeptor)
tg	transgen
TNF	Tumornekrose-Faktor
TNFR1	Tumornekrose-Faktor Rezeptor Typ 1
TNFR2	Tumornekrose-Faktor Rezeptor Typ 2
TRADD	<i>TNF-receptor-associated death domain</i>
TRAF	<i>TNF-receptor-associated factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
U	unit
v/v	<i>volume/volume</i>
w/v	<i>weight/volume</i>
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
-/-	defizient
~	in etwa

## 1 Einleitung

### 1.1 Antikörper

#### 1.1.1 Struktur von Antikörpern

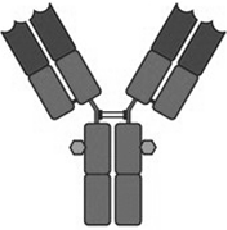
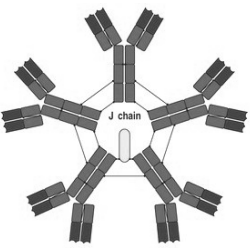
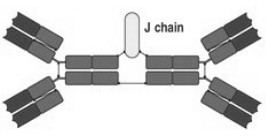
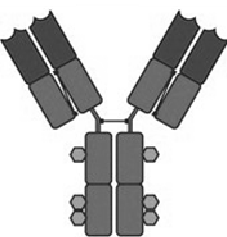
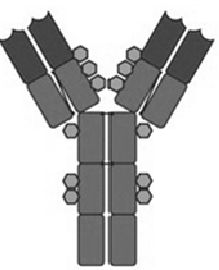



Antikörper sind eines der Hauptbestandteile des humoralen Abwehrsystems unseres Körpers. Strukturell bestehen Immunglobuline aus zwei identischen schweren Ketten, den „*heavy chains*“ (H) und zwei leichten Ketten, den „*light chains*“ (L) vom  $\kappa$ - oder  $\lambda$ -Typ. Es lassen sich die fünf Hauptvarianten  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  der schweren Kette unterscheiden, welche die Immunglobulinklassen IgG, IgM, IgA, IgD und IgE definieren (Porter, 1973).

Während das IgM meist als Pentamer vorkommt und vor allem für die primäre Immunantwort verantwortlich ist, findet man das IgA als Dimer vorwiegend in seromukösen Körpersekreten und Schleimhäuten, wo es als Barriere für eingedrungene Krankheitserreger dient. Die beiden Antikörperfraktionen vom Typ D und Typ E treten als Monomere auf der Oberfläche von Immunzellen, wie den B-Lymphozyten, basophilen Granulozyten und Mastzellen auf. Das IgG, das die Hauptmenge der Immunglobuline bildet und wiederum in weitere Subtypen unterteilt werden kann, stellt das wichtigste Reservoir für die Reaktion auf Sekundärinfektionen dar (Janeway, 2005).

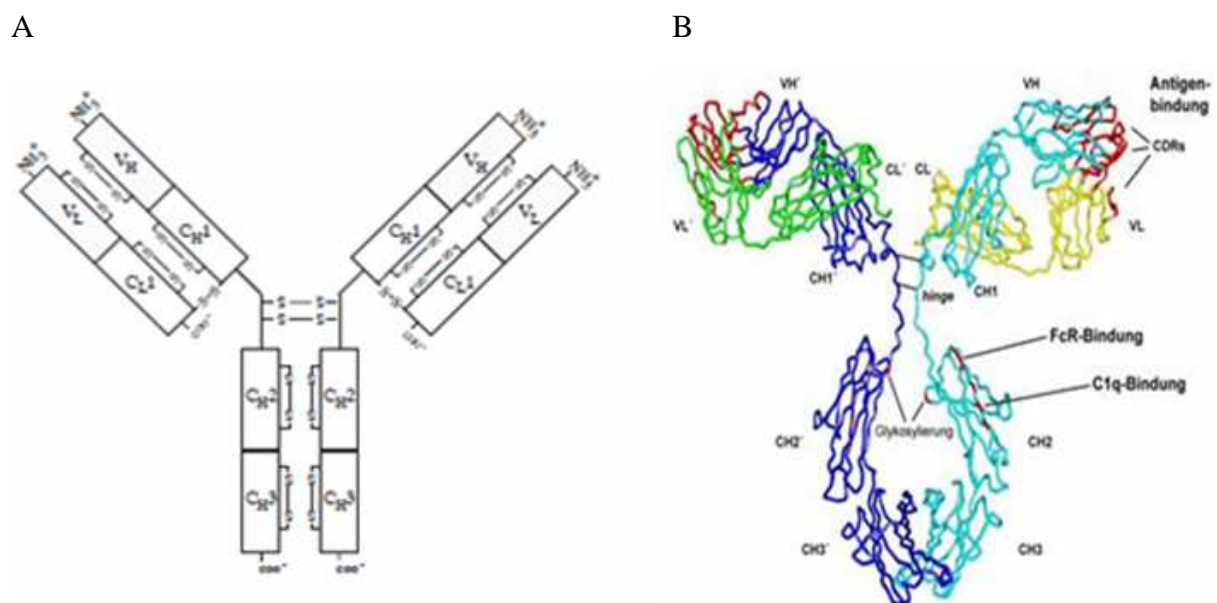
Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Struktur, das Vorkommen und die wichtigsten Funktionen der fünf Immunglobulinklassen.

**Tabelle 1: Überblick über die fünf Immunglobulinklassen**

(nach Janeway, 2007; Abbas, 2007)

Anti-körper-Klasse	Häufigkeit	Strukturschema	Vorkommen	Hauptaufgaben
<b>IgG</b>	70-75 %		Vorwiegend in Lymphe und Interzellularflüssigkeit; Transplazentarer Übertritt in den fetalen Blutkreislauf; in gebundener Form auf Makrophagen	Reaktion auf Sekundärinfektionen, Aktivierung des Komplementsystems, Opsonierung, Neonatale Immunität
<b>IgM</b>	10 %		Intravaskulär und auf zirkulierenden B-Zellen (membranegebundene Form)	Primäre Immunantwort, Aktivierung des Komplementsystems
<b>IgA</b>	15-20 %		Schleimhäute der Atemwege, Augen, Magen-Darm -Trakt, Urogenitaltrakt; Muttermilch, Körpersekrete	Abwehr von Krankheitserregern in Schleimhäuten, passive neonatale Immunität
<b>IgD</b>	<1 %		Membranständig auf reifen, naiven B-Zellen; in geringen Mengen in Blut und Lymphe	Naiver B-Zell – Rezeptor, Funktion weitgehend unbekannt
<b>IgE</b>	<1 %		Meist membranständig auf Mastzellen und basophilen Granulozyten	Allergische Reaktionen, Mastzelldegranulation, Parasitenabwehr
<b>Legende:</b>  <b>Antigenbindende Einheit mit CDR-Regionen</b>  <b>Konstante Region</b>  <b>Bindungsstelle für Komplementfaktoren</b>				

Die L-Ketten mit einem Molekulargewicht von je 25 kDa bestehen aus zwei Domänen ( $V_L$ ,  $C_L^1$ ), während die beiden H-Ketten aus je vier Domänen aufgebaut sind ( $V_H$ ,  $C_H^1$ ,  $C_H^2$ ,  $C_H^3$ ) und ein Molekulargewicht von 55 bis 77 kDa besitzen. Die Verknüpfung der Ketten erfolgt über Disulfidbrücken. Am Amino-Terminus sowohl der leichten, als auch der schweren Kette befinden sich die variablen Domänen ( $V_L$  bzw.  $V_H$ ), die die CDR-Regionen (*complementarity determining regions*) beinhalten und so die Antikörperspezifität bedingen (Abb.1). Der konstante Teil des Antikörpers (C-Region) bestimmt den Isotyp des Immunglobulins und dient als Effektorregion der Makrophagen- und Komplementbindung (Janeway, 2007).



**Abbildung 1: Aufbau eines IgG-Moleküls**

A ) Schematischer Aufbau (nach Berg, 2003)

Jedes Antikörpermolekül besteht aus zwei leichten (L) und zwei schweren (H) Ketten. Die L-Ketten bestehen aus den beiden Domänen  $V_L$  und  $C_L^1$  und sind an ihrem Carboxyl-Terminus ( $\text{COO}^-$ ) über eine Disulfidbrücke ( $-S-S-$ ) mit der H-Kette verknüpft. Die H-Ketten bestehen aus vier Domänen ( $V_H$ ,  $C_H^1$ ,  $C_H^2$ ,  $C_H^3$ ). Am Amino-Terminus ( $\text{NH}_3^+$ ) der beiden Ketten befinden sich die antigenbindenden variablen Domänen  $V_L$  und  $V_H$ .

B) Molekularstruktur (nach Clark, 1997)

Die  $V_L$ - und  $V_H$ -Domänen verfügen über hypervariable CDR-Peptidregionen (rot). In der Gelenkregion (*hinge-region*) sind die schweren Ketten über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die Bindungsstelle für die Fc-Rezeptoren und das Komplement C1q befindet sich in der konstanten Region  $C_H^2$  und  $C_H^3$  des Antikörpers.

Das körpereigene Repertoire an Immunglobulinen ermöglicht es dem Organismus nahezu jede erdenkliche körperfremde Struktur zu erkennen und mit einer antigenspezifischen Immunantwort darauf zu reagieren. Über die Immunglobulin-Rezeptoren der B-Lymphozyten und die T-Zell-Rezeptoren der T-Lymphozyten werden zwei verschiedene Subsysteme wirksam, die auf eingedrungene Antigene entweder im Sinne einer zellulären, oder aber einer humoralen Immunantwort reagieren können.

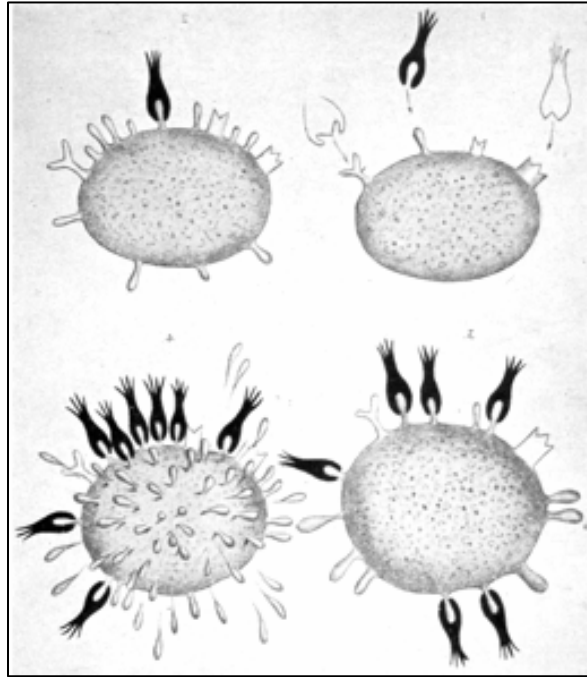
Die zelluläre Immunantwort wird dabei vor allem durch eine Aktivierung der T-Lymphozyten vermittelt, die mit Hilfe ihrer cytotoxischen T-Zellen befallene Körperzellen aus dem Organismus eliminieren.

In der humoralen Immunantwort werden die in der Blutbahn und Lymphflüssigkeit zirkulierenden Krankheitserreger abgewehrt. Nach der Bindung eines Antigens an den Immunglobulin-Rezeptor einer B-Zelle wird diese aktiviert und differenziert sich weiter zu einer Plasmazelle, die daraufhin antigenspezifische Antikörper produziert (Abbas et al., 2007). Die Vielfalt der verschiedenen Antikörper ergibt sich dabei sowohl durch die somatische Rekombination eines breiten Keimbahnrepertoires, als auch durch die Mutation verschiedener Genabschnitte in den CDR-Regionen (Xu und Davis, 2000). Die konstante Antikörperdomäne bleibt dagegen in ihrer Sequenz nahezu stabil und dient als Angriffspunkt für die Komplement- und Rezeptorbindung.

### **1.1.2 Funktionen und Aufgaben von Antikörpern**

Paul Ehrlich, einer der Pioniere in der Immunologie, bildete mit seiner Seitenkettentheorie die Grundlage zur Entstehung einer spezifischen Immunabwehr. Die Theorie begründete sich in der Annahme, dass jede Zelle eiweißhaltige Substanzen und eine Serie von Seitenketten (Rezeptoren) besitzt, welche Nährstoffe und giftige Substanzen aufnehmen können (Ehrlich und Morgenroth, 1904). Diese Seitenketten passen zu den chemischen Gruppen der eingedrungenen Toxine, die dann vermehrt als Sekretionsprodukte der Zellen in das Blut abgegeben werden, wo sie wie Schlüssel und Schloss als Antitoxin wirken (Ehrlich, 1901). In weiteren Forschungen fand Ehrlich im Gegensatz zu seiner ursprünglichen Annahme heraus, dass nicht alle Körperzellen, sondern nur die B-Lymphozyten dazu fähig sind, Antikörper zu bilden (Abb.2).

Für diese Theorie, die die Grundlage der modernen Immunologie schuf, erhielt Paul Ehrlich 1908 den Nobelpreis für Medizin.



**Abbildung 2: Aussehen und Wirkungsweise von Immunglobulinen.**

**(nach Ehrlich und Morgenroth, 1904)**

Die aus einer frühen Publikation der Wissenschaftler stammende Grafik zeigt die selektive Anheftung von Seitenketten an schädliche Strukturen und gibt bereits einen Hinweis auf die Spezifität dieser Bindung.

Nach heutiger Erkenntnis sind Immunglobuline Proteine, die als Antwort auf eine Fremdsubstanz, den sogenannten Antigenen, vom Immunsystem gebildet werden. Diese Antigene können sowohl Proteine, als auch Polysaccharide oder Nukleinsäuren sein. Sie werden entweder mittels membranständiger Antikörper von Lymphozyten gebunden und auf deren Oberfläche präsentiert, oder aber im Sinne einer humoralen Immunantwort antikörpervermittelt bekämpft. Die von den B-Lymphozyten abstammenden Plasmazellen sezernieren dazu spezifische Antikörper, die mit einer hohen Affinität an die körperfremden Strukturen binden und sie damit aus dem Körper eliminieren (Janeway, 2005). Neben der Neutralisierung eingedrungener Krankheitserreger dienen Antikörper auch der Opsonierung von Pathogenen. Das bedeutet, dass die Oberfläche der Fremdzelle durch Immunglobuline umhüllt wird und so für die Phagozytose markiert ist. Über den Fc-Bereich der Antikörper können dann die endozytierenden Zellen mit ihren entsprechenden Rezeptoren binden und die Antigen-Antikörper-Komplexe aus dem Organismus eliminieren.

Eine zusätzliche, über den Fc-Bereich der Immunglobuline vermittelte Effektorfunktion der Antikörper ist die Aktivierung des Komplementsystems. Dabei handelt es sich um eine komplexe Gruppe von Serumproteinen, die weitere Entzündungsreaktionen vermittelt. Über die Bindung des Komplementfaktors C1q an die Antikörper wird eine Reaktionskaskade



aktiviert, die zu einer der wichtigsten Komponenten des natürlichen Abwehrsystems zählt (Janeway, 2007).

Derjenige Bereich des Immunogens, an den das Immunglobulin bindet, wird als Epitop, die entsprechende Bindungsstelle des Antikörpers als Paratop bezeichnet (Abbas et al., 2007). Aufgrund der Tatsache, dass ein Antigen meist zahlreiche unterschiedliche Epitope trägt, werden in vivo nach einem Antigenkontakt eine Vielzahl an B-Lymphozyten aktiviert, die alle unterschiedliche, epitopspezifische Antikörper produzieren. Durch diese Rekrutierung mehrerer Zelllinien entsteht eine polyklonale Antikörperantwort, die eine ganz gezielte und äußerst effektive Abwehr krankheitserregender Organismen ermöglicht.

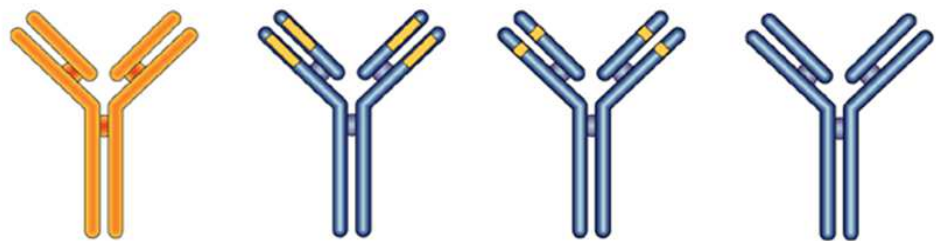
### **1.1.3 Herstellung monoklonaler Antikörper**

Monoklonale Antikörper (mAK) sind Antikörper, die von einer auf einen einzigen B-Lymphozyten zurückgehenden Zelllinie, dem Zellklon produziert werden. Diese hochspezifischen Antikörper sind in der Lage an ein einzelnes Epitop des Antigens zu binden und haben somit sowohl auf dem Gebiet der Forschung, als auch in der medizinischen Diagnostik und Therapie ein breites Einsatzgebiet (Abbas et al., 2007).

Der Beginn der Entwicklung der Hybridomatechnik zur Herstellung monoklonaler Antikörper geht auf Milstein und Köhler zurück, denen es erstmals im Jahre 1975 gelang, immunkompetente B-Lymphozyten mit Zellen eines Milzzell-Tumors, den Myelomazellen zu fusionieren. Die resultierenden Hybridomazellen konnten im Gegensatz zu den ursprünglichen B-Lymphozyten über sehr lange Zeit kultiviert werden, da sie in der Lage waren, sich in regelmäßigen Abständen selbst zu vermehren. Außerdem zeigte sich, dass jeder Klon dieser Hybridomazelllinie einen ganz spezifischen Antikörper sezernierte. Damit war die Menge an Antikörpern, die aus einer Immunisierung gewonnen werden konnte, nicht mehr begrenzt. Die Immunglobuline mussten fortan nicht mehr aus dem Serum eines immunisierten Tieres isoliert werden, sondern konnten aus dem Kulturüberstand der wachsenden Klone dauerhaft gewonnen werden. Zusätzlich war eine Selektion der gewünschten Antikörper aus dem Gesamtbestand möglich geworden (Köhler und Milstein, 1975; Cruse und Lewis, 2006). Die Forscher erhielten für ihre Entwicklung der Technik zur Gewinnung monoklonaler Antikörper im Jahre 1984 den Nobelpreis für Medizin.

Dieses Verfahren findet auch heute noch breite Anwendung um je nach Fragestellung monoklonale Antikörper mit maßgeschneiderten Eigenschaften herzustellen. Die therapeutische Applikation muriner Antikörper beim Menschen ist jedoch durch die Induktion von Human- $\alpha$ -Maus-Antikörpern (HAMA) limitiert. Da diese zu allergischen Reaktionen bis

hin zum anaphylaktischen Schock führen können, wurde die Technik zur Herstellung mAK in den letzten Jahrzehnten stetig weiterentwickelt. So stehen heutzutage auch das Verfahren der Phagen-Display-Technik (Winter et al., 1994) und die Verwendung transgener Tiere zur Verfügung (Ganten und Ruckpaul, 2008). Durch die Einführung von chimären, humanisierten und humanen Antikörpern wurde schrittweise der Anteil mäuselicher Proteine verringert (Abb.3). Dadurch konnte nicht nur die Immunogenität des Antikörpers deutlich herabgesetzt, sondern auch dessen Kinetik durch eine verlängerte Halbwertszeit und bessere Bindungsfähigkeit deutlich verbessert werden (Albrecht, 2009).



	Muriner mAK	Chimärer mAK	Humanisierter mAK	Humaner mAK
Relativer Anteil an Mausprotein in %	100	ca. 25	5-10	0
Suffix	-omab	-ximab	-zumab	-umab

**Abbildung 3: Überblick über die verschiedenen rekombinanten Antikörper.**

(nach Brekke und Sandlie, 2003) (gelb: mäuseliches Protein, blau: humanes Protein)

a) Der murine Antikörper besteht zu 100 % aus Mausprotein b) Der chimäre Antikörper enthält nur im variablen Teil der antigenbindenden Einheit Mausprotein, der konstante Teil des Immunglobulins besteht aus humanen Peptidsequenzen c) Beim humanisierten Antikörper ist nur die Aminosäuresequenz der *complementarity determing region* (CDR) murinen Ursprungs d) Der humane Antikörper enthält keine Fremdpeptide.

#### 1.1.4 Anwendung monoklonaler Antikörper

Durch die große Spezifität in der Erkennung von Epitopen und ihren selektiven Bindungseigenschaften spielen monoklonale Antikörper sowohl in der Forschung, als auch in der Industrie eine wichtige Rolle. Als ein wichtiges molekulares Werkzeug biochemischer Fragestellungen können mAK der Aufklärung von Signalübertragungsmechanismen oder

auch der Lokalisation, Quantifizierung und Charakterisierung von Proteinen dienen (Caponi, 1999; Janeway, 2007).

Eines der Hauptanwendungsgebiete der mAK liegt jedoch in der Medizin, in der mAK sowohl zur Krankheitsprophylaxe, als auch zur Diagnostik und Therapie verschiedener Erkrankungen eingesetzt werden. Prinzip der passiven Immunisierung ist es, mit Hilfe der Impferen eine hohe Konzentration an monoklonalen Antikörpern zu verabreichen, die gegen den betreffenden Krankheitserreger oder dessen Toxin gerichtet sind. Beispiele solcher Immunseren werden zur Neutralisation des Tetanus-, Tollwut- oder Diphtherie-Toxins eingesetzt oder dienen der Eliminierung von Krankheitserregern wie dem Hepatitis-, Masern-, Mumps- oder Röteln- Virus (*Paul Ehrlich Institut*). Auch die Schwangerschaftskomplikation einer Rhesusunverträglichkeit, bei der in den mütterlichen Kreislauf übergetretene kindliche rhesuspositiver Erythrozyten eine Immunreaktion auslösen, die zur Bildung mütterliche Antikörper gegen die kindlichen Erythrozyten führt, kann durch die Gabe neutralisierender  $\alpha$ -D-Immunglobuline unmittelbar nach der Geburt verhindert werden. Die Immunisierung der rhesusnegativen Mutter durch das Rhesus-Antigen des Kindes wird damit verhindert. In der Immundiagnostik können mAK für den Nachweis zahlreicher infektiöser und systemischer Erkrankungen eingesetzt werden. Durch die große Vielfalt immunologischer Verfahren wie dem ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent-Assay*), der Immunpräzipitation (Ausfällung von Antigenen durch mAK), der Immunkomplexbildung (Bildung von großen Aggregaten aus mAK und Antigenen) und der Agglutination (Verklumpungsreaktion von antigenbeschichteten Partikeln mit mAK) können lösliche Substanzen im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden.

Einen besonderen Stellenwert nimmt hier die Diagnostik von Tumorerkrankungen ein, in der mAK als molekulare Marker sowohl quantitativ, als auch qualitativ immunphänotypische Oberflächenproteine verschiedener Zelllinien erkennen. Mittels spezifischer, gegen die CD-Epitope (*Cluster of Differentiation*) auf Lymphozyten gerichteter Antikörper werden heutzutage leukämische Erkrankung diagnostiziert und klassifiziert. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, gegen bestimmte CD-Epitope gerichtete mAK in der Immun- oder Krebstherapie einzusetzen. So war der gegen das CD3 Molekül gerichtete mAK *Muromonab* im Jahre 1986 der erste therapeutisch eingesetzte mAK, der zur Therapie akuter Transplantatabstoßungen zugelassen wurde (Johnson, 2002). Ein weiterer, zur Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen eingesetzter mAK ist der chimäre mAK *Rituximab*, der spezifisch gegen das CD-20-Oberflächenmolekül der Lymphozyten gerichtet ist und deren Proliferation hemmt (Hainsworth et al., 2002; Janeway, 2007).

Derzeit sind in Deutschland insgesamt 29 monoklonale Antikörper als Arzneimittel verfügbar (*Paul Ehrlich Institut*), die neben der Krebstherapie auch zur Immunsuppression nach Organtransplantationen und zur Behandlung zahlreicher Autoimmunerkrankungen eingesetzt werden (Albrecht et al., 2009). Zahlreiche mAK befinden sich derzeit noch in der präklinischen und klinischen Erprobung.

## 1.2 Tumor Nekrose Faktor

Der Begriff des „Tumor Nekrose Faktors“ leitet sich aus dessen Erstbeschreibung im Jahre 1975 ab, bei der in Versuchen mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten Mäusen eine TNF-induzierte Tumornekrose beobachtet wurde (Carswell et al., 1975). Ein bereits zuvor entdecktes Molekül, das in Lymphozyten produziert wurde und ebenfalls zytotoxische Aktivität besaß, wurde aufgrund seiner Herkunft als Lymphotoxin (LT $\alpha$ ) bezeichnet. Weitere Erforschungen und Sequenzanalysen der beiden Moleküle zeigten eine Homologie von 30 %, sowie das Vorhandensein gemeinsamer Rezeptoren und funktioneller Eigenschaften (Aggarwal et al., 1985; Hahlgans und Pfeffer, 2005). Somit waren zwei der wichtigsten Zytokine der großen Familie der TNF-Proteine gefunden. Unabhängig davon wurde ein als *Kachektin* bezeichnetes Protein identifiziert, welches bei malignen Erkrankungen und chronischen Entzündungen zu den häufig auftretenden Auszehrungserscheinungen der Patienten führte. Dieses entsprach dem bereits bekannten TNF (Beutler und Cerami, 1985). Weitere Vertreter der bis heute bekannten 19 Mitglieder der TNF-Proteine sind unter anderem der CD28-, der CD40-, der TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*), der Fas- sowie der RANK-Ligand. Zusammen mit ihren 29 spezifischen Rezeptoren bilden sie die TNF-Rezeptor Superfamilie (TNFR-SF) (Aggarwal, 2003; Hahlgans und Pfeffer, 2005). Als gemeinsames Merkmal dieser Zytokinfamilie gilt der Aufbau aus drei identischen Proteinketten und die Trimerisierung ihrer Rezeptoren nach Ligandenbindung (Idriss und Naismith, 2000; Janeway, 2007). Die Funktionen ihrer Mitglieder sind zwar vielfältig, liegen aber vor allem in der Immunabwehr, der Regulation von Differenzierungs- und Aktivierungsprozessen und der Entwicklung und Aufrechterhaltung von lymphatischem Gewebe (Hahlgans und Pfeffer, 2005; Locksley et al., 2001).

TNF, eines der wichtigsten Vertreter der TNF-Proteine kommt sowohl als membranassoziiertes 26 kDa schweres, als auch in einer löslichen Form mit einem Molekulargewicht von 17 kDa vor. Über die Aktivität einer Serin-Metalloproteinase (*TNF-converting enzyme*, TACE) wird das membrangebundene TNF in den Extrazellularraum

freigesetzt (Idriss und Naismith 2000; MacEwan, 2002). Dieses lösliche TNF ist jedoch erst nach stattgehabter Trimersierung dazu befähigt, die TNF-Rezeptoren effektiv zu aktivieren. TNF wird als Reaktion auf infektiöse und immunologische Stimuli vor allem durch aktivierte Makrophagen und Monozyten, aber auch von Lymphozyten, Mastzellen, NK-Zellen, neutrophilen Granulozyten, Endothelzellen und Fibroblasten gebildet und vermittelt so seine zahlreichen biologischen Funktionen auf nahezu allen Körperzellen (Locksley et al., 2001). Durch seine proinflammatorischen, wachstums- und differenzierungsfördernden Effekte gilt TNF als Hauptmediator akuter Entzündungsreaktionen und spielt in der Abwehr bakterieller, viraler und parasitärer Infektionen eine ganz zentrale Rolle. Aufgrund seiner zytotoxischen Eigenschaften ist es auch für die Tumorumwehr von grosser Bedeutung (Aggarwal et al., 2002; Hehlhans und Pfeffer, 2005). Über eine Stimulierung der Sekretion weiterer proinflammatorischer Zytokine wie dem IL-1 und IL-6, wird die Immunantwort ausgedehnt und kann so im Falle einer überschießenden Immunantwort auch zur Entstehung zahlreicher akuter und chronischer Krankheitsbilder beitragen. Eine inadäquat hohe Freisetzung und chronische Überproduktion an TNF gilt daher als pathophysiologische Ursache zahlreicher Entzündungs- und Autoimmunerkrankungen wie z.B. dem Morbus Crohn, der Rheumatoiden Arthritis, der Psoriasis-Arthritis oder der Multiplen Sklerose (Kwon et al., 2003; Wajant et al., 2003). Auch das Auftreten von Diabetes mellitus, Arteriosklerose, Herzinfarkten, Allergien und zahlreichen weiteren Erkrankungen ist mit einem erhöhten Serumspiegel an TNF vergesellschaftet (Aggarwal et al., 2002; Locksley et al., 2001). Bei der Entstehung des septischen Schocks, sowie dem Auftreten akuter Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen konnte dem Zytokin eine wesentliche Beteiligung nachgewiesen werden (Aggarwal et al., 2002; Beutler und Cerami., 1985; Hehlhans und Pfeffer, 2005; Männel und Echtenacher, 2000).

### **1.2.1 Die TNF –Rezeptoren**

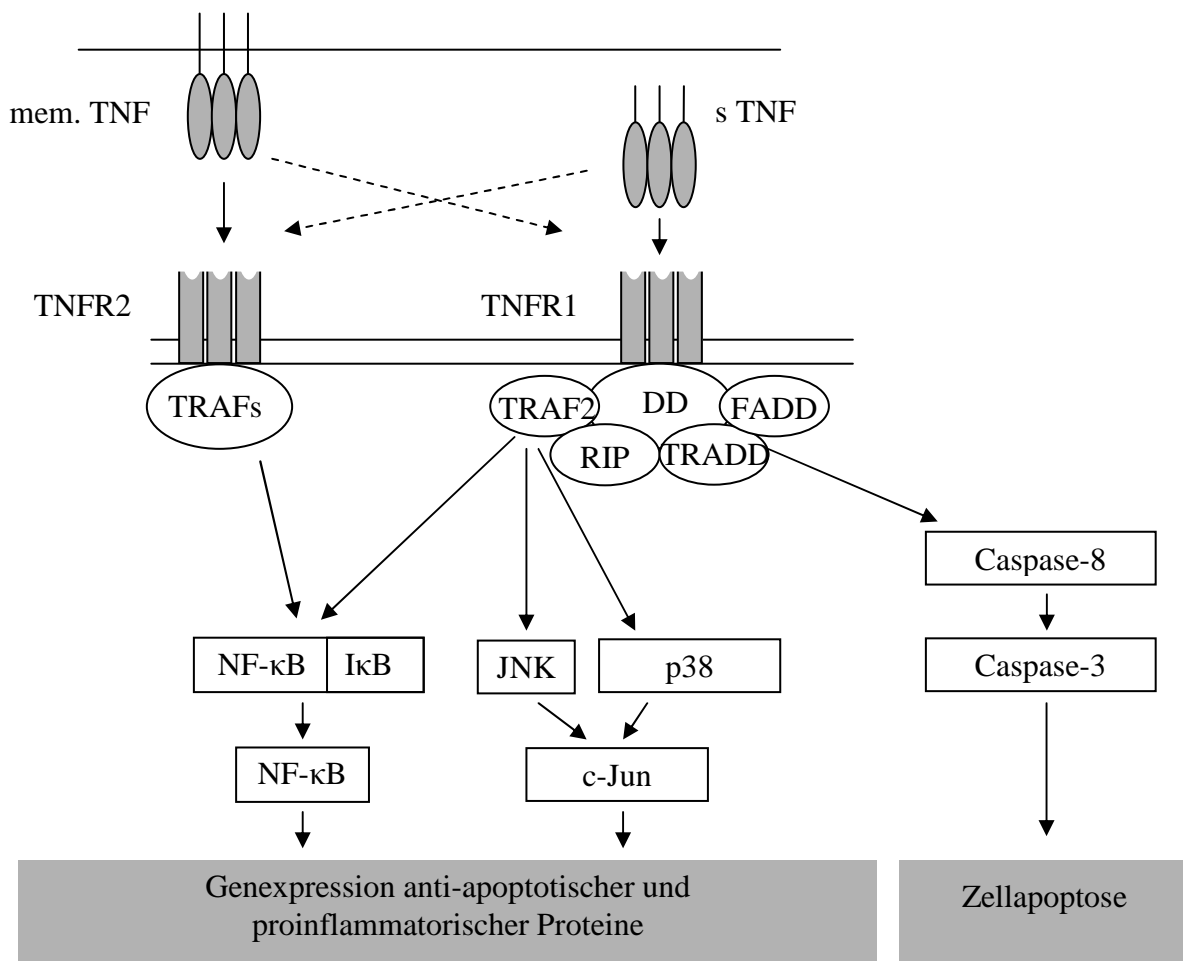
TNF ist ein Zytokin, das seine große Anzahl biologischer Funktionen über die Aktivierung zweier Rezeptoren, dem TNFR1 (Tumornekrose-Faktor Rezeptor Typ 1, CD120a, p55/60) und dem TNFR2 (Tumornekrose-Faktor Rezeptor Typ 2, CD120b, p75/80) vermittelt.

Sowohl bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Holtmann et al., 2002b), als auch bei den Krankheitsbildern der Rheumatoiden Arthritis (Gattorno et al., 1996; Kruglov, 2008), dem Systemischen Lupus erythematodes (Aderka et al., 1993), der Glomerulonephritis (Vielhauer, 2005), sowie bei akuten Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantationen (Al-Lamki et al., 2001, Hoffmann et al., 2009) wurde eine erhöhte

Expression an TNF-Rezeptoren registriert. Der Zusammenhang der Rezeptorkonzentration und der Pathogenese dieser und zahlreicher weiterer Krankheitsbilder zeigt, dass den TNF-Rezeptoren in der Vermittlung sowohl immunologischer, als auch inflammatorischer Signalkaskaden eine äußerst bedeutende regulatorische Rolle zukommt (Aderka, 1996; Aggarwal et al., 2003).

Der TNFR1 und der TNFR2 gelten dabei als klassische Vertreter der TNF-Rezeptor Superfamilie, die inzwischen 29 Rezeptoren umfasst (Hehlhans und Pfeffer, 2005). Dabei handelt es sich um Typ-I-Membranproteine, die als gemeinsames Merkmal mehrere cysteinreiche Domänen im extrazellulären Bereich besitzen (Idriss und Naismith, 2000). Zwischen den verschiedenen TNF-Rezeptoren gibt es allerdings auch einige Unterschiede. Im Gegensatz zum TNFR1, der außer auf Erythrozyten auf der Oberfläche aller Zellen konstitutiv vorhanden ist, ist die Expression des TNFR2 streng reguliert und auf die Zellen des Immunsystems, sowie Endothelien und die Zellen des Nervensystems beschränkt (Aggarwal, 2003). Ein weiterer Unterschied besteht in der Affinität der Rezeptoren zum löslichen bzw. membrangebundenen TNF. Während der TNFR1 durch beide Formen aktiviert werden kann, gilt der TNFR2 vor allem für die membrangebundene Form des TNF als Zielstruktur (Grell et al., 1995; Grell et al., 1998b). Weitere experimentelle Untersuchungen zeigten, dass der Maus-TNFR1 (mTNFR1) sowohl humanes (hTNF), als auch Maus-TNF (mTNF) bindet, während der Maus-TNFR2 (mTNFR2) nur von mTNF aktiviert wird, daneben aber auch mit LT $\alpha$  als Liganden interagiert (Ameloot et al., 2001; Lewis et al., 1991). Ein gemeinsames Merkmal aller TNF-Rezeptoren ist die Trimerisierung des Rezeptors nach der Bindung des Liganden (Chan et al., 2000), die eine notwendige Voraussetzung für den Ablauf der jeweiligen rezeptorspezifischen Signalkaskade ist (Abb.4).

Ein Großteil der TNF- Rezeptoren, darunter auch der TNFR1 und der TNFR2, kommen neben der membrangebundenen Form (mem.TNFR) auch in einer löslichen Form (sTNFR) vor. Die löslichen Rezeptoren werden dabei entweder proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten, oder aber direkt in den Extrazellularraum sezerniert. Sie können dann die Funktion des TNF antagonisieren und fungieren somit als natürliche TNF-Inhibitoren (Engelmann et al., 1989; Gatanaga et al., 1990; Hehlhans und Männel, 2002; Hehlhans und Pfeffer, 2005). Dabei konkurrieren sie mit den zellständigen Rezeptoren um den gleichen Liganden und übernehmen so die extrazelluläre Regulierung der lokalen und systemischen TNF-Konzentration.



**Abbildung 4: Überblick über die Signalkaskaden des TNFR1 und TNFR2**

(modifiziert nach Kruglov et al., 2008)

Der TNFR1 rekrutiert nach Trimerisierung weitere Adaptermoleküle wie das RIP (*receptor-interacting protein-1*) und TRAF2 (*TNFR-associated factor 2*), die über eine Aktivierung des NF-κB (*nuclear factor κB*), c-Jun (*N-terminale Kinase*) und p38, zur Expression proinflammatorischer und anti-apoptotischer Gene führen. Über die zyttoplasmatische Todesdomäne (*death domain*, DD) des TNFR1 werden die Proteine TRADD (*TNF receptor-associated death domain*), FADD (*Fas-associated death domain*) und RIP angelagert, was über eine Aktivierung weiterer Effektorcaspasen zur Zellapoptose führt. Die Signalkaskade des TNFR2 führt ebenfalls über die NF-κB-Signalkaskade zur Hochregulation proinflammatorischer und anti-apoptotischer Proteine.

### 1.2.1.1 Die Signaltransduktion des TNFR1

Die Tatsache, dass der TNFR1 auf nahezu allen Zellen des menschlichen Körpers vorkommt, zeigt seine zentrale Stellung in der Vermittlung zahlreicher für den Organismus essentieller Aufgaben (Aggarwal et al., 2003; Kruglov et al., 2008).

Zu der Gruppe der Apoptose-induzierenden Rezeptoren der TNFR-SF gehören neben dem TNFR1 auch der Fas (CD95) und der TRAIL-Ligand (*TNF-related apoptosis inducing ligand*), die als gemeinsames Merkmal eine intrazelluläre Todesdomäne (*death domain*, DD) besitzen, die als Bindestelle für weitere Adaptermoleküle dient. So können sich nach der Ablösung des inhibitorischen Proteins SODD (*silencer of death domain*) von der Innenseite der Membran weitere Proteine wie das TRAF2 (*TNFR-associated factor 2*), RIP (*receptor-interacting protein-1*) und FADD (*Fas-associated death domain*) an die frei gewordene TRADD (*TNF receptor-associated death domain*) anlagern. Durch die Rekrutierung weiterer Signalproteine wie der Caspase 8 entsteht der sogenannte *death inducing signaling complex* (DISC), der über die Caspase 3 zu einer Fragmentierung der DNA und zur Apoptose führt (Abbas, 2007; Baker und Reddy, 1998; MacEwan, 2002).

Die ebenfalls über den TNFR1 vermittelte anti-apoptotische und proinflammatorische Signalkaskade verläuft über die Proteinkinasen RIP-1 und TRAF2, die eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung des NF- $\kappa$ B besitzen (Kelliher et al., 1998). Durch Phosphorylierung der Inhibitorproteine I- $\kappa$ B (*inhibitory  $\kappa$ B*) wird NF- $\kappa$ B im Zytoplasma aktiviert und gelangt in den Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor die Expression diverser Gene steuert (Devin et al., 2000). Zusätzlich kann über die Rekrutierung von TRAF-2 und RIP-1 auch eine Aktivierung von MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein-*) wie JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und p38 erfolgen, was ebenfalls zu einer vermehrten Produktion proinflammatorischer, anti-apoptotischer und proliferativer Proteine führt (Wajant et al., 2003).

#### 1.2.1.2 Die Signaltransduktion des TNFR2

Der TNFR2 wird, anders als der TNFR1, nicht konstitutiv auf nahezu allen Zellen, sondern erst nach Stimulierung proinflammatorischer Zytokine, bakterieller Proteine oder Noxen auf den Zellen des Immunsystems exprimiert (Aggarwal, 2003). Obwohl noch nicht alle strukturellen und funktionellen Eigenschaften des TNFR2 hinreichend geklärt sind, wird ihm eine große Bedeutung in der Regulation und Modulation zahlreicher Entzündungsprozesse, sowie in der Steuerung der Zellproliferation und Zelldifferenzierung zugeschrieben (MacEwan, 2002). Über eine direkte Bindung von Adapterproteinen wie dem TRAF2, wird der anti-apoptotische Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktiviert (Wajant et al., 2003; Mac Ewan, 2002).

Neben der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade können die TRAFs auch die c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK) aktivieren und so die Transkription zahlreicher weiterer Proteine initiieren. Der TNFR2 besitzt zwar selbst keine intrazelluläre Todesdomäne, kann aber über die Anlagerung des



TRAF2 an die DD-haltige Proteinkinase RIP die Caspase-Kaskade aktivieren und so die über den TNFR1 vermittelte Apoptose induzieren (Grell et al., 1993; Haridas et al., 1998; Pimentel-Muinos und Seed, 1999; MacEwan, 2002).

Da der TNFR2 seinen Liganden mit sehr hoher Affinität bindet, entstand die Hypothese des „ligand passing“. Demnach fängt der TNFR2 das TNF ab und erhöht damit die lokale Konzentration des Zytokins, was dann wiederum auch die Bindung an den TNFR1 erleichtert (Tartaglia et al., 1993b). Neben dieser Rolle als Signalverstärker der über den TNFR1-vermittelten Signalkaskaden, liegt eine der physiologischen Hauptfunktionen des TNFR2 in der Steuerung der Thymozytenproliferation (Grell et al., 1998a; Tartaglia et al., 1993a) und der Co-Stimulation von T-Zellen (Aspalter et al., 2003; Chen et al., 2007; Kim et al., 2006). Eine pathophysiologische Bedeutung besitzt der TNFR2 in der Entstehung zahlreicher immunologischer Krankheitsprozesse. Bei Patienten, die an chronisch-entzündlichen oder autoimmunbedingten Erkrankungen wie z.B. dem Morbus Crohn (Holtmann et al., 2002a) oder der Glomerulonephritis (Vielhauer et al., 2005) leiden, wurde eine Hochregulation des TNFR2 auf den Körperzellen nachgewiesen. Auch das Auftreten von akuten Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen ist mit der vermehrten Expression des TNFR2 vergesellschaftet (Brown et al., 2002; Hoffmann et al., 2009).

## **1.2.2 Therapeutische Möglichkeiten im TNF/TNFR-System**

### **1.2.2.1 TNF-Therapie**

Aufgrund der Beobachtungen früherer Studien, in denen TNF eine nekrotisierende Wirkung auf Tumorgewebe zeigte, erschien das Zytokin als ein interessantes und vielversprechendes Mittel in der Behandlung von Krebserkrankungen. In klinischen Studien zeigte sich jedoch, dass mit der Applikation des Zytokins zahlreiche Nebenwirkungen wie Fieber, Übelkeit, Appetitverlust, Herzrhythmusstörungen, Leukopenie und Neuro- sowie Lebertoxizität auftraten (*European Medicines Agency*, 2009; Heim et al. 1990). Die zum Teil sehr schweren Begleiterscheinungen einer TNF-Therapie machen daher eine äußerst strenge Indikationsstellung und genaue Therapieüberwachung notwendig. In Deutschland befindet sich derzeit nur das Arzneimittel Tasonermin (Handelsname Beromun®) in der klinischen Anwendung. Dabei handelt es sich um das rekombinant hergestellte TNF, das bei nicht resezierbaren Weichteilsarkomen der Extremitäten zur Vermeidung oder Herauszögerung einer Amputation und zur palliativen Behandlung eingesetzt wird. Da die notwendige Dosis für eine systemische Anwendung äußerst toxisch ist, muss die Applikation über eine isolierte

Extremitäten-Perfusion unter Vollnarkose und Hyperthermie erfolgen (Eggermont et al., 1997; Eggermont und Hagen, 2001; Lejeune et al., 2000; Verhoef et al., 2007).

Der Wirkmechanismus von TNF besteht darin, dass es die Proliferation der Tumorzellen hemmt und die Apoptose der Endothelien induziert. Dadurch wird das Tumorgefäßsystem geschädigt und die Permeabilität des Tumorgewebes für das co-applizierte Zytostatikum Melphalan (Handelsname Alkeran®) deutlich erhöht (Rüegg et al., 2006; Lejeune und Rüegg, 2006). Da die systemische Toxizität den Einsatz von TNF in der Klinik stark einschränkt, ist die Erforschung neuerer Möglichkeiten einer TNF-Therapie von großer Bedeutung. Erste Erfolge zeigten sich bereits durch die Entwicklung eines neuen Derivats des TNF-Liganden, das aus 3 monomeren Einzelketten besteht und über Peptid-linker verbunden ist. Hierbei konnte eine gegenüber dem trimeren TNF deutlich gesteigerte Stabilität, sowie eine erhöhte anti-tumorale Aktivität bei einer deutlich verminderten Toxizität nachgewiesen werden (Krippner-Heidenreich et al., 2008).

Dies lässt auf eine entscheidende Weiterentwicklung und einen Fortschritt in der Krebstherapie hoffen.

#### **1.2.2.2 Anti-TNF-Therapie**

Da bekannt ist, dass ein pathologisch erhöhter TNF-Serumspiegel im Organismus mit der Entstehung zahlreicher entzündlicher und auto-immunologischer Erkrankungen einhergeht, ist diese Molekül seit jeher Zielstruktur in der immunologischen Forschung und bei der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien.

Durch die Antagonisierung des TNF kann seine biologische Aktivität direkt gehemmt werden und zugleich auch die Ausschüttung weiterer pro-inflammatorischer Zytokine, wie dem IL-1, dem IL-6 und dem IFN- $\gamma$  unterbunden werden (Charles et al., 1999). Daher nimmt die Anti-TNF-Therapie in der Behandlung zahlreicher Autoimmunerkrankungen, wie der Rheumatoiden Arthritis (Moreland, 1997; Olsen und Stein., 2004), der Psoriasis-Arthritis (Mease et al., 2000), der Ankylosierenden Spondylitis (Elewaut und Matucci-Cerinic, 2009), der Colitits Ulcerosa und dem Morbus Crohn (Deventer, 1999; Reimund et al., 2007; Wiedmann et al., 2009) eine bedeutende Rolle ein.

Da mit einer Anti-TNF-Therapie auch die physiologische Funktion des Zytokins unterbunden wird, ergeben sich im Rahmen der Therapie häufige Probleme und zum Teil schwerwiegende Nebenwirkungen (Weinberg und Buchholz, 2006). Da TNF ein wichtiger Mediator in der Abwehr intrazellulärer Infektionserreger, wie dem *Mycobacterium tuberculosis* oder dem Bakterium *Listeria monocytogenes* ist, sind das Auftreten dieser schweren Infektionen eine

häufige Begleiterscheinung in der anti-TNF-Therapie (Slifman et al., 2003). Ein signifikant erhöhtes Risiko von Reaktivierungen latenter Tuberkuloseinfektionen konnte bereits in mehreren Studien belegt werden (Long und Gardam, 2003; Gardam et al., 2003; Gómez-Reino et al., 2003). Aber auch zahlreiche weitere bakterielle und virale Infektionen, sowie opportunistische Pilzinfektionen können im Rahmen der anti-Zytokin-Therapie auftreten (Berg, 2004; Lee et al., 2007; Slifman et al., 2003).

Da ein Teil der eingesetzten Medikamente mäuseiches Protein enthält, kann es im Serum der Patienten zur Antikörperbildung gegen die chimären anti-TNF-Antikörper kommen (HACA: *human anti-chimeric antibodies*). Dadurch ist nicht nur die Halbwertszeit und die biologische Wirksamkeit des Medikaments herabgesetzt, sondern auch das Risiko für lokale allergische Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock deutlich erhöht (Baert et al., 2003). Daraus ergibt sich für die anti-TNF-Therapie eine äußerst strenge Indikationsstellung und die Notwendigkeit einer engmaschigen Therapieüberwachung, um den therapeutischen Benefit mit den einhergehenden Nebenwirkungen für jeden Patienten individuell abzuwägen.

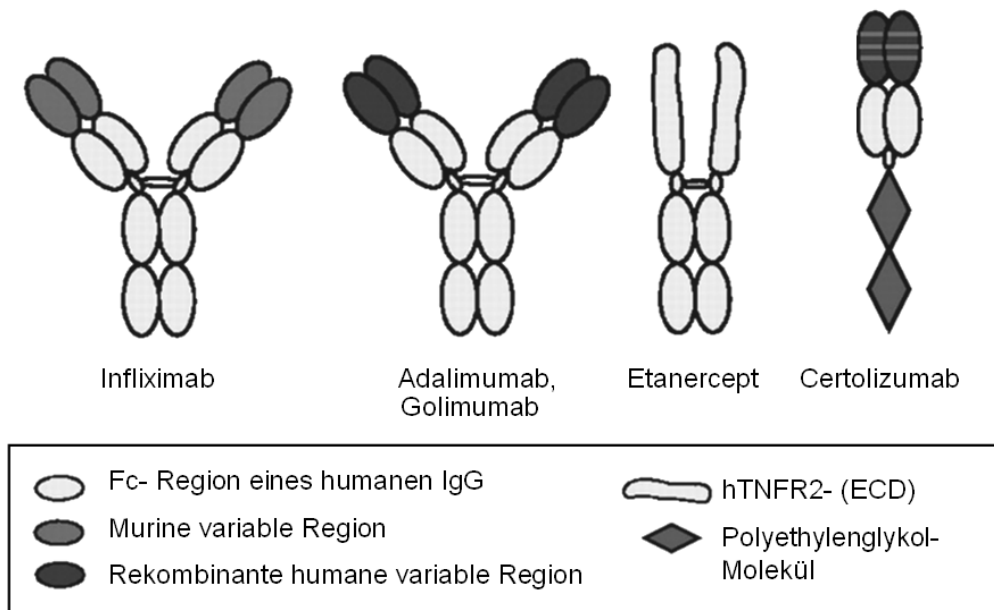
In Deutschland befinden sich derzeit fünf anti-TNF-Therapeutika in der klinischen Anwendung und ein Weiteres in der klinischen Erprobung (Abb.5).

Infliximab (Handelsname Remicade®), ein bereits 1999 zugelassener chimärer monoklonaler Antikörper wird zur Behandlung der Rheumatoiden Arthritis, dem Morbus Crohn, der Colitis Ulcerosa, der Ankylosierenden Spondylitis und der Psoriasis-Arthritis eingesetzt (*Paul Ehrlich Institut*). Der konstante Teil besteht aus einem humanen IgG<sub>1</sub>κ und wurde mit der variablen Region eines Maus-α-hTNF-Antikörpers fusioniert. Infliximab neutralisiert sowohl lösliches, als auch membrangebundenes TNF (Scallon et al., 1995, Scallon et al., 2002) und verhindert damit die Ausschüttung weiterer pro-inflammatorischer Zytokine und die Expression von Adhäsionsmolekülen, was die Einwanderung von Leukozyten in das Gewebe unterbindet (Charles et al., 1999; Taylor et al., 2000).

Um die Immunogenität und die Kinetik dieses monoklonalen Antikörpers zu verbessern, wurde mittels Phage-Display-Technologie der vollständig humanisierte anti-TNF-Antikörper Adalimumab (Handelsname Humira®) hergestellt. Das Wirkprofil und das Anwendungsgebiet des seit 2003 zugelassenen monoklonalen Antikörpers entsprechen demjenigen des Infliximab. Seit 2009 steht der humane Antikörper Golimumab (Handelsname Simponi®) zur Verfügung, der zur Therapie der Rheumatoiden Arthritis, der Ankylosierenden Spondylitis und der Psoriasis Arthritis eingesetzt wird. Im Gegensatz zum Adalimumab erfolgt hier die subkutane Injektion nurmehr einmal im Monat (Boyce et al., 2010).

Ein weiterer, seit dem Jahre 2000 für die anti-TNF-Therapie zugelassener Arzneistoff ist das Etanercept (Handelsname Enbrel®). Dabei handelt es sich um ein gentechnologisch hergestelltes, dimeres Fusionsprotein, das aus der extrazellulären Bindungsdomäne des humanen TNFR2 und dem konstanten Anteil eines humanen IgG<sub>1</sub>-Antikörpers besteht (Peppel et al., 1991). Dieses besitzt eine deutlich verlängerte Halbwertszeit und eine gesteigerte Affinität für TNF, wobei eine zusätzliche Bindungsfähigkeit für LT $\alpha$  besteht. Das Wirkspektrum entspricht jedoch im Wesentlichen demjenigen der bereits beschriebenen anti-TNF-Antikörper.

Das neueste, seit 2009 auch in Europa zugelassene  $\alpha$ -TNF-Therapeutikum ist das zur Behandlung des Morbus Crohn und der Rheumatoiden Arthritis zugelassene Certolizumab-Pegol (Handelsname Cimzia®). Bei dem unter dem Begriff CDP-870 entwickelten TNF-Blocker handelt es sich um ein Fab-Fragment eines rekombinanten, humanisierten monoklonalen Antikörpers, der an Polyethylenglykol konjugiert wurde. In zwei doppelblind-angelegten, Placebo- kontrollierten Studien (*PRECISE 1* und *PRECISE 2*) mit über 660 Patienten, die an mittelschwererem und schwerem Morbus Crohn litten, konnte die Wirksamkeit des Medikaments anhand eines in 23 % der Fälle sinkenden Entzündungsparameters CRP (C-reaktives Protein) gegenüber 16 % in der Placebogruppe nachgewiesen werden (Sandborn et al., 2007, Schreiber et al., 2007). Durch weitere Studien konnte die Effektivität einer Certolizumab-Therapie auch für Patienten mit Rheumatoider Arthritis belegt werden (Fleischmann et al., 2009; Keystone et al., 2008; Smolen et al., 2009).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung bisher erhältlicher TNF-Antagonisten.**

(nach Fleischmann und Shealy, 2003)

Strukturell enthalten Infliximab und Adalimumab die konstante Fc-Region eines humanen IgG.

Etanercept ist ein Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne (ECD) des hTNFR2 und dem konstanten Anteil eines humanen Immunglobulins. Certolizumab enthält das Fab-Fragment eines humanen IgG, das an ein Polyethylenglykol-Molekül gekoppelt ist.

Da für viele Patienten nach Versagen konventioneller Therapiemaßnahmen eine anti-TNF-Therapie oft die einzige therapeutische Möglichkeit verbleibt, ist die Entwicklung neuer Medikamente, die ganz spezifisch in das komplexe TNF/TNFR-System eingreifen, dringend notwendig. Eine Blockierung der Krankheits-verursachenden Signalkaskaden unter Beibehaltung protektiver und lebenswichtiger Funktionen des Zytokins ist Gegenstand der derzeitigen pharmakologischen Forschung. Das Erreichen eines maximalen Therapieerfolgs unter Minimierung unerwünschter Nebenwirkungen sind oberstes Ziel in der Weiter- und Neuentwicklung von anti-TNF-Therapeutika.

### 1.3 Zielstellung der Arbeit

Da eine fehlgesteuerte TNF-Produktion in der Pathophysiologie zahlreicher Autoimmunerkrankungen und einer Vielzahl akuter und chronisch-entzündlicher Krankheitsbilder (z.B. Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn, Psoriasis-Arthritis) maßgeblich beteiligt ist, ist die Erforschung der genauen Pathomechanismen von grundlegender Bedeutung. Die derzeit erhältlichen anti-TNF-Therapeutika weisen multiple und häufig sehr schwerwiegende Begleiterscheinungen auf, wie es etwa die erhöhte Infektionsgefahr und die mögliche Reaktivierung latenter Tuberkulose-Infektionen sind. Für die Weiterentwicklung der anti-Zytokin-Therapie ist daher ein gezielter Eingriff in die jeweilige TNF-vermittelte Signalkaskade notwendig. Mit der Entwicklung Rezeptor-selektiver Medikamente ergäbe sich die Möglichkeit, den Therapieerfolg zu erhöhen und zugleich die Nebenwirkungen einer systemischen  $\alpha$ -TNF-Therapie zu minimieren.

Um die Wirkungen TNFR2-vermittelter Signalkaskaden besser aufklären zu können, wäre es wichtig, einen spezifischen, gegen den mTNFR2 gerichteten Antikörper zur Verfügung zu haben, der durch seine blockierenden oder aktivierenden Eigenschaften eine genaue Erforschung des Rezeptors ermöglicht. Ein solcher, in der Maus hergestellter monoklonaler Antikörper mit agonistischer oder antagonistischer Aktivität auf seinen Zielrezeptor wäre ein geeignetes Instrument, die Auswirkungen der Liganden-Rezeptor-Interaktion auch in vivo grundlegend zu erforschen. In einem weiteren Schritt könnten dann neue therapeutische Ansatzpunkte entwickelt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, mit Hilfe der Hybridomatechnik einen neuartigen, gegen den TNFR2 der Maus gerichteten monoklonalen Antikörper mit aktivierenden oder blockierenden Eigenschaften herzustellen. Der gewonnene Antikörper sollte dann auf seine Bindungsspezifität im ELISA-, im Dot Blot- und im Western Blot-Verfahren, sowie in der Durchflusszytometrie überprüft werden.

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung wurde der Antikörper auf mögliche kreuzreaktive Eigenschaften gegenüber dem mTNFR1 im TNF-induzierten Zytotoxizitätstest hin untersucht. Zur Analyse agonistischer oder antagonistischer Eigenschaften des Antikörpers auf den mTNFR2 wurde dieser in weiteren Bioassays mit der cytotoxischen CT-6 Zelllinie eingesetzt.

**Tabelle 2: Liste derzeit erhältlicher TNFR2-Antikörper**

Produkt-bezeichnung	Klon	Antikör-perart	Konjugationsart	Funktion	Hersteller
Maus- $\alpha$ -hTNFR2	80M2	monoklonal	biotinyliert, unkonjugiert	antagonistisch	Cell Sciences
Maus- $\alpha$ -hTNFR2	80M2	monoklonal	FITC PE		MBL- International
Maus- $\alpha$ -hTNFR2	MR2-1	monoklonal	biotinyliert, unkonjugiert	agonistisch	Cell Sciences
Maus- $\alpha$ -hTNFR2		polyklonal		agonistisch	Cell Sciences
Kaninchen- $\alpha$ -hTNFR2		polyklonal		agonistisch	Cell Sciences
Hamster- $\alpha$ -mTNFR2	TR75-89	monoklonal	AF PE Biotin		Serotec
Hamster- $\alpha$ -mTNFR2		polyklonal		agonistisch	Cell Sciences
Ratte- $\alpha$ -mTNFR2	HM102	monoklonal	unkonjugiert biotinyliert	agonistisch	Cell Sciences
Ratte- $\alpha$ -mTNFR2	HM102	monoklonal	FITC PE		Cell Sciences
Kaninchen- $\alpha$ -mTNFR2		polyklonal		agonistisch	Cell Sciences

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

**Tabelle 3: Übersicht Geräte**

Gerät	Hersteller
ARIA Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
Blotanlage	Biometra
Begasungsbrutschrank-Cell safe	Integra Biosciences, Baar, Schweiz
ELISA Reader	MWG Biotech, Ebersberg
Eppendorf Thermoblock	Eppendorf, Hamburg
FACScan Flow Cytometer	Becton-Dickinson, Heidelberg
Geltrockner Slab Dryer Model 483	BioRad, München
Gelelektrophorese-Apparaturen	BioRad, München
Hypercassette	Amersham, Little Chalfont, GB
Inkubatoren	Heraeus, Hanau
Laminair Flow HB 2448– Sterilbank	Heraeus, Hanau
Mikroskop (Zellkultur)	Olympus, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Brand, Gießen
Optimax X-RAY Film Processor	MS Laborgeräte Heidelberg
Vortexer MS2 Minishaker	IKA Works, Wilmington, NC, USA
Waagen:	
Sartorius R16OP	Sartorius, Göttingen
Sartorius L2200S	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen:	
Beckmann J2-21 M/E Zentrifuge	Beckmann, München
Beckmann L-70 Ultrazentrifuge	Beckmann, München
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Thermoblock BIO TDB-100	Hartenstein, Würzburg



### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 4: Übersicht Verbrauchsmaterialien**

Verbrauchsmaterial	Hersteller
6-, 24-, 48-, 96-Lochplatten	Falcon, Heidelberg
Bottle Top Sterilfilter 75 mm	Nalgene
ELISA 96-Loch Platten	Falcon, Heidelberg
Eppendorf Cups	Eppendorf, Hamburg
FACS Röhrchen	Labor Schubert, Schwandorf
FUJI Medical X-Ray FILM 100 NIF 18x 24	FUJIFILM Corporation, Tokyo
HiTrap Protein G HP Sepharose-Säule 1ml	GE Healthcare, Freiburg
Mikrotiterplatten	Falcon, Heidelberg
Pipetten, steril	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF-Millipore Membran (Pore size 0,45 µm) für Dot Blot	Bio Rad Laboratories
PVDF-Millipore Membran (Pore size 0,45 µm) für Western Blot	Millipore
Spritzen	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter Minisart 0,80 µm	Sartorius, Göttingen
Whatman Filterpapier	Laborcenter, Nürnberg
Zellkulturflaschen (70, 250, 750 ml)	Falcon, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Falcon, Heidelberg
Zellsieb 40 µm	Falcon, Heidelberg
Zellkulturschale, 10 cm	Falcon, Heidelberg

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 5: Übersicht Chemikalien und Reagenzien**

Chemikalie/ Reagenz	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Deisenhofen
3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Actinomycin D	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Agarose, electrophoresis grade	GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
AP Tabletten	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
CFSE	Invitrogen, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R250	Fluka, Buchs, Schweiz
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DMEM-Fertigmedium	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Entwicklerflüssigkeit NOWA Solution A, B 250 ml	MIBITEC GmbH, Göttingen
Dulbecco's PBS steril (1x)	PAA Laboratories, Austria
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
Gentamycin	ICN, Meckenheim
G-418 (Geneticin) Solution 50 mg/ml	Roche Diagnostics, Mannheim
HEPES	Sigma Aldrich, Deisenhofen
L-Glutamin	PAN Biotech
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Penicillin-Streptomycin-Lösung	PAN Biotech
Polyethylenglycol	Roche Diagnostics, Mannheim
Protein Standard All Blue	Bio Rad
Ratiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Rec IL 2 ( $10^5$ U/ml)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
RPMI 1640	Sigma Aldrich, Deisenhofen
TNF human, rekombinant	BASF, Ludwigshafen
TNF murin, rekombinant	Peptotech, London
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypanblau	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Trypsin-EDTA-Lösung	PAN Biotech
Tween® 20	Fluka, Buchs, Schweiz

## 2.1.4 Lösungen, Puffer und Medien

**Tabelle 6: Übersicht Lösungen, Puffer und Medien**

Lösung/ Puffer/ Medium	Attribute
Blockierlösung für ELISA, Dot Blot, Western Blot	10 % (w/v) Magermilchpulver in TBS
Coomassie-Blau Färbelösung	10 % HCl 40 % Ethanol 0,2 % Coomassie Brilliant Blue 50 % dem. H <sub>2</sub> O
Coomassie-Entfärbelösung	40 % Ethanol 10 % Essigsäure 50 % dem. H <sub>2</sub> O
Einfriermedium für Zellen (2x)	20 % DMSO 80 % FCS
ELISA-Substratpuffer (AP) für Sigma Tabletten	9,8 % (v/v) Diethanolamin 24 mM MgCl <sub>2</sub> in dem. H <sub>2</sub> O (pH 8,9 )
ELISA-Waschlösung (TBS-Tween®)	0,05 % (v/v) Tween® 20 in TBS
Erythrocyten-Lysepuffer	0,17 M NH <sub>4</sub> Cl
FACS-Waschpuffer	10 % (v/v) FCS in PBS
HAT-Medium	500 ml RPMI 1640 0,02 % (v/v) HAT-Lösung 10 % (v/v) FCS 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung 50 µM Mercaptoethanol
HT-Medium	500 ml RPMI 1640 0,02 % (v/v) HT-Lösung 10 % (v/v) FCS 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung 50 µM Mercaptoethanol
Lämmli-Elektroden Puffer (5x)	120 mM Tris Base 0,95 M Glycin 0,5 % SDS
Lämmli-Probenpuffer (4x)	250 mM Tris-HCl, pH 6,8 4 % SDS 40 % Glycin 20 % Mercaptoethanol 0,16 % Bromphenolblau mit konz. HCl auf pH 6,8 einstellen 4 ml Mercaptoethanol auf 100 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen
Milchpulverlösung zur Antikörperverdünnung	0,5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS
PBS (pH 7,3)	137 mM NaCl 6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

	2,7 mM KCl in dem. H <sub>2</sub> O
PBS-T	500 µl Tween® 20 in 1 Liter PBS
Sammelgel-Trispuffer (pH 6,8)	0,5 M Tris-HCl
SDS-Probenpuffer	20 % Glycerin 125 mM Tris (pH 6,8) 2 % SDS 0,02 % Bromphenolblau 2 % β-Mercaptoethanol
Standardkulturmedium	500 ml RPMI 1640 10 % FCS 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung 50 µM Mercaptoethanol
TBS-Puffer (pH 7,4)	140 mM NaCl 3 mM KCl 16 mM Tris in dem. H <sub>2</sub> O
TBS-T-Puffer	500 µl Tween® in 1 Liter TBS
Trenngel-Trispuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris-HCl
Triton X-100 Lösung 0,1 %	0,1 % Triton X-100 in dem. H <sub>2</sub> O
Trypanblau-Lösung	0,15 % Trypanblau 150 mM NaCl

### 2.1.5 Antikörper

**Tabelle 7: Übersicht Antikörper**

Antikörper	Konzentration	Einsatzgebiet	Hersteller
Goat- $\alpha$ -mouse-IgG ( $\gamma$ -chain specific)-AP	1:5000	ELISA	Sigma Aldrich
$\alpha$ -mouse-IgG <sub>1</sub> -HRP	1:5000	Western Blot	BD Pharmingen
Goat- $\alpha$ -mouse-IgG (whole molecule)-POX	1:5000	Western Blot	Sigma Aldrich
mouse- $\alpha$ -Penta-His-IgG	1:5000	Western Blot	Quiagen
Donkey- $\alpha$ -Human-IgG- HRP/F(ab') <sub>2</sub> -Fragment	1:5000	Western Blot	Jackson Immuno Research (Dianova)
$\alpha$ -mouse-CD3 $\epsilon$ (Klon 2C11)	1:5000	T-Zell Stimulierung	Becton-Dickinson
$\alpha$ -mouse-CD28 (Klon 35.71)	1:5000	T-Zell Stimulierung	Becton-Dickinson
$\alpha$ -mouse-CD120b-AF 647	1:20	FACS	Serotec
$\alpha$ -mouse-CD8a-PE	1:200	FACS	BD Pharmingen
$\alpha$ -mouse-CD4-PaBlue	1:200	FACS	BD Pharmingen
$\alpha$ -mouse-Fc $\gamma$ -receptor II/III (Klon 2.4G2, 1,84 mg/ml)	1:150	FACS	Eigene Herstellung
$\alpha$ -mouse-IgG-FITC	1:100	FACS	Dako-Cytomation

## 2.1.6 Zelllinien

**Tabelle 8: Übersicht Zelllinien**

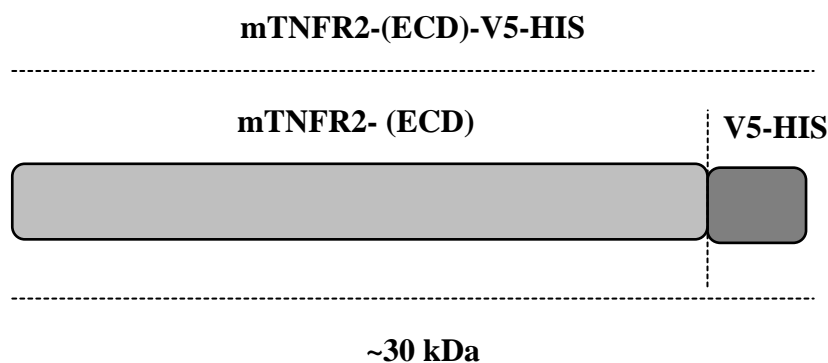
Zelllinie	Kulturmedium	Wachstum	Splitfrequenz/ Splitverhältnis
CHO tg (Chinesische Hamsteroarialzelllinie, transgen)	RPMI 1640 10 % (v/v) FCS 1 % Pen/Strep-Lösung 0,1 % G-418(Neomycin)	adhärent	2x pro Woche 1:20
CHO wt (Chinesische Hamsteroarialzelllinie, Wildtyp)	RPMI 1640 10 % (v/v) FCS 1 % Pen/Strep-Lösung	adhärent	2x pro Woche 1:20
CT-6 (Maus-T-Zelllinie)	RPMI 1640 10 % (v/v) FCS 1 % Pen/Strep-Lösung 3 mM L-Glutamine, 1 mM Sodium Pyruvate, 50 µM β-Mercaptoethanol, 100 U/ml rec IL2	Suspension	2x pro Woche 1:2
L-929 (Maus- Fibrosarkomzelllinie)	RPM 1640 10 % (v/v) FCS, 1 % Pen/Strep-Lösung 0,1 % Gentamycin	adhärent	3x pro Woche 1:20
Sp2/0-Ag14 (Maus-Myelomazelllinie)	RPMI 1640 10 % (v/v) FCS 1 % Pen/Strep-Lösung	Suspension	2x pro Woche 1:5

### 2.1.7 Rekombinante Rezeptorproteine

Für die Immunisierung der Mäuse wurde das von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Daniela Männel rekombinant hergestellte Rezeptorprotein mTNFR2-(ECD)-V5-His (Abb.6) verwendet. Dieses Protein wurde mit Hilfe eines DesMTA Vektors (pMTBip/V5-His, Invitrogen) in Drosophila-Schneider 2-Zellen (DS-2) exprimiert und kloniert.

Es enthält die extrazelluläre Domäne (ECD) des Maus-TNFR2 (mTNFR2), an dessen Carboxylende ein V5-Epitop und ein Polyhistidin-*tag* gekoppelt sind.

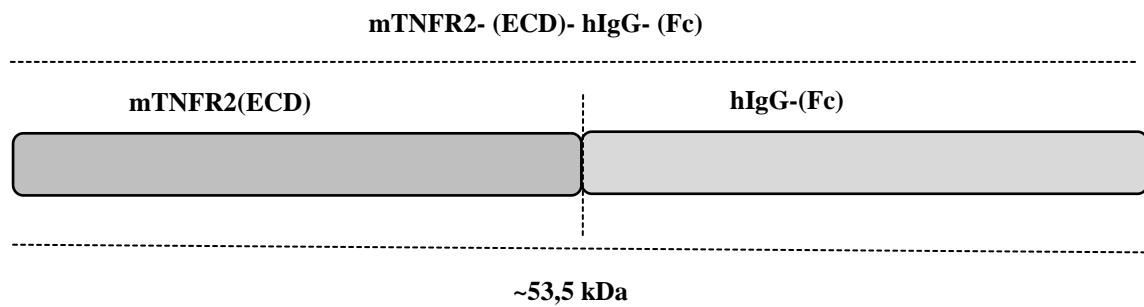
Im Folgenden wird das Protein mit der Bezeichnung *mTNFR2-V5-His* angegeben.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung und Molekulargewicht des zur Immunisierung verwendeten Proteins mTNFR2-(ECD)-V5-His.**

Das in DS-2 Zellen exprimierte und klonierte Protein besteht aus der extrazellulären Domäne (ECD) des Maus-TNF-Rezeptors Typ2 (mTNFR2). Daran wurde ein V5-Epitop mit einem Polyhistidin-*tag* (V5-HIS) gekoppelt. Das molekulare Gesamtgewicht liegt bei etwa 30 kDa.

Der Nachweis spezifischer Antikörper im ELISA-, Dot Blot- und Western- Blot- Verfahren erfolgte mit dem rekombinanten mTNFR2-(ECD)-IgG-(Fc)-Protein (Abb.7). Dieses wurde ebenfalls mittels DesMTA-Vektor (pMTBip/V5-His, Invitrogen) in den DS-2-Zellen hergestellt. Es enthält die ECD des mTNFR2, an die eine Fc-Domäne eines humanen IgG gekoppelt ist. Das Protein erhält im weiteren Text die Bezeichnung *mTNFR2-IgG*.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung und Molekulargewicht des zum Nachweis spezifischer Antikörper verwendeten Proteins mTNFR2-(ECD)-IgG-(Fc).**

Das in DS-2 Zellen hergestellte Protein besteht aus der extrazellulären Domäne (ECD) des mTNFR2, und einer Fc-Domäne eines humanen IgG (hIgG-Fc). Das Gesamtgewicht des Rezeptorkonstrukts liegt bei etwa 53,3 kDa.

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorenen Proteine wurden bei Bedarf aufgetaut und von der Ausgangskonzentration 1mg/ml auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

### 2.1.8 Tiere

**Tabelle 9: Tiere**

Tier	Herkunft
C57BL/6J TNFR2 <sup>-/-</sup>	Eigenzucht Universität Regensburg
C57BL/6J Wildtyp	Jenvier, Le Genest, France
NMRI-Mäuse	Charles River, Sulzfeld

## 2.2 Methoden

Alle Experimente fanden, wenn nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur (RT) und unter Verwendung steriler Reagenzien und Gefäße statt.

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Zellkulturbedingungen

Die zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer Sterilbank (Laminar Flow HERAsafe® KS) durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien und Primärkulturen wurden mit den angegebenen Medien (Tab.8) bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ - Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Begasungsbrutschrank (Cell safe) kultiviert.



### **2.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen**

Zur Herstellung eines Zellstocks wurden die Zellen zunächst bei 300 g pelletiert und anschließend in Einfriermedium (10 % DMSO, 40 % [v/v] FCS, 50 % RPMI) resuspendiert. Es wurden 1 ml Aliquots mit  $1-10 \times 10^6$  Zellen in Kryoröhrchen gefüllt und zunächst bei  $-80^\circ\text{C}$  in einer Styroporbox eingefroren. Nach einigen Tagen wurde diese zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff auf  $-196^\circ\text{C}$  überführt.

Zur erneuten Inkulturnahme tiefgefrorener Zellen wurden diese in einem  $37^\circ\text{C}$  Wasserbad aufgetaut, in 15 ml Medium gewaschen und anschließend bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Kulturmedium aufgenommen.

### **2.2.1.3 Kultivierung adhärenter Zellen**

Die verwendeten adhärent wachsenden Zelllinien wurden in 75 ml Zellkulturflaschen in 20 ml Medium kultiviert und in regelmäßigen Abständen in dem in Tabelle 8 angegebenen Verhältnis gesplittet. Zur Passage der Zellen wurde der konfluente Zellrasen mit 15 ml sterilem PBS gespült und anschließend mit einer Trypsin-EDTA-Lösung für einige Sekunden inkubiert. Nach Lockerung der interzellulären Bindungen (Optische Kontrolle im Mikroskop) wurde die Trypsin-EDTA-Lösung abgesaugt und 10 ml frisches Medium zugegeben. Leichtes Beklopfen der Kulturflaschen brachte die Zellen in Suspension, sodass 1 ml entnommen und in eine neue Zellkulturflasche überführt werden konnte. Das Gesamtvolumen wurde durch die Zugabe von frischem Medium erreicht.

### **2.2.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl**

Sollten die Zellen mit einer definierten Anzahl ausgesät werden, wurde mit Hilfe des Trypanblau-Ausschlusstests die Vitalzellzahl in der Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Dazu wurden zunächst 10  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension mit dem Farbstoff Trypanblau versetzt, der nur von toten Zellen aufgenommen wird und diese dunkelblau anfärbt. Die Lebendzellzahl pro ml ergab sich aus der Anzahl der ungefärbten Zellen in den 16 Quadraten der Zählkammer  $\times$  Verdünnungsfaktor  $\times 10^4$ .

### **2.2.1.5 Präparation von Zellsuspensionen aus Milzgewebe**

Die Mäuse wurden durch Genickzug getötet, das Fell mit Alkohol (70 %) befeuchtet und von der entsprechenden Körperregion abpräpariert. Die Milz wurde unter der Sterilbank entnommen und in zusatzfreies, eiskaltes RPMI-Medium überführt. In einer sterilen

Petrischale wurde anhaftendes Bindegewebe entfernt und die Zellen mit einer Pinzette vorsichtig aus der Organhülle gestrichen. Danach folgte die Zugabe von 100 µl Kollagenase D und Inkubation der Zellen bei 37 °C für 15 Minuten. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren der Zellaggregate, sowie das Filtern durch ein Zellsieb (Maschenweite 40 µm) wurden die Zellen in Suspension gebracht. Nach einem Waschschrift in 50 ml Medium (RPMI 1640, 10% [v/v] FCS, 1% Penicillin-Strptomycin-Lösung, 50 µM Mercaptoethanol) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert. Um noch enthaltene Erythrozyten zu entfernen, wurden 5 ml Hämolysepuffer (0,17 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) zugegeben und die Reaktion nach 10 min mit 45 ml Medium abgestoppt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellsediment in 10 ml frischem Medium aufgenommen und die Zellzahl nach dem in 2.2.1.4 beschriebenen Verfahren bestimmt.

Zwischen allen Arbeitsschritten wurden sowohl das Organ, als auch die gewonnen Zellen stets auf Eis gelagert.

#### **2.2.1.6 Präparation von Zellsuspensionen aus Thymusgewebe**

Zur Gewinnung von Thymuszellen wurde der Thymus von 4-8 Wochen alten Mäusen entnommen. Um das Organ nicht zu beschädigen, wurden die Tiere durch Einschläfern mit Diethylether getötet. Das Fell wurde nach Desinfektion mit Alkohol (70 %) vom gesamten Rumpf abgelöst. Der Brustkorb wurde aufgeschnitten, das Organ entnommen und in eiskaltes RPMI- Medium gegeben. Mit Hilfe eines sterilen Spritzenstempels wurde das Organ durch ein Zellsieb (Maschenweite 40 µm) gedrückt und die Zellsuspension nach dem in Kap. 2.2.1.5 beschriebenen Verfahren weiter aufbereitet.

#### **2.2.1.7 Stimulation von T-Zellen**

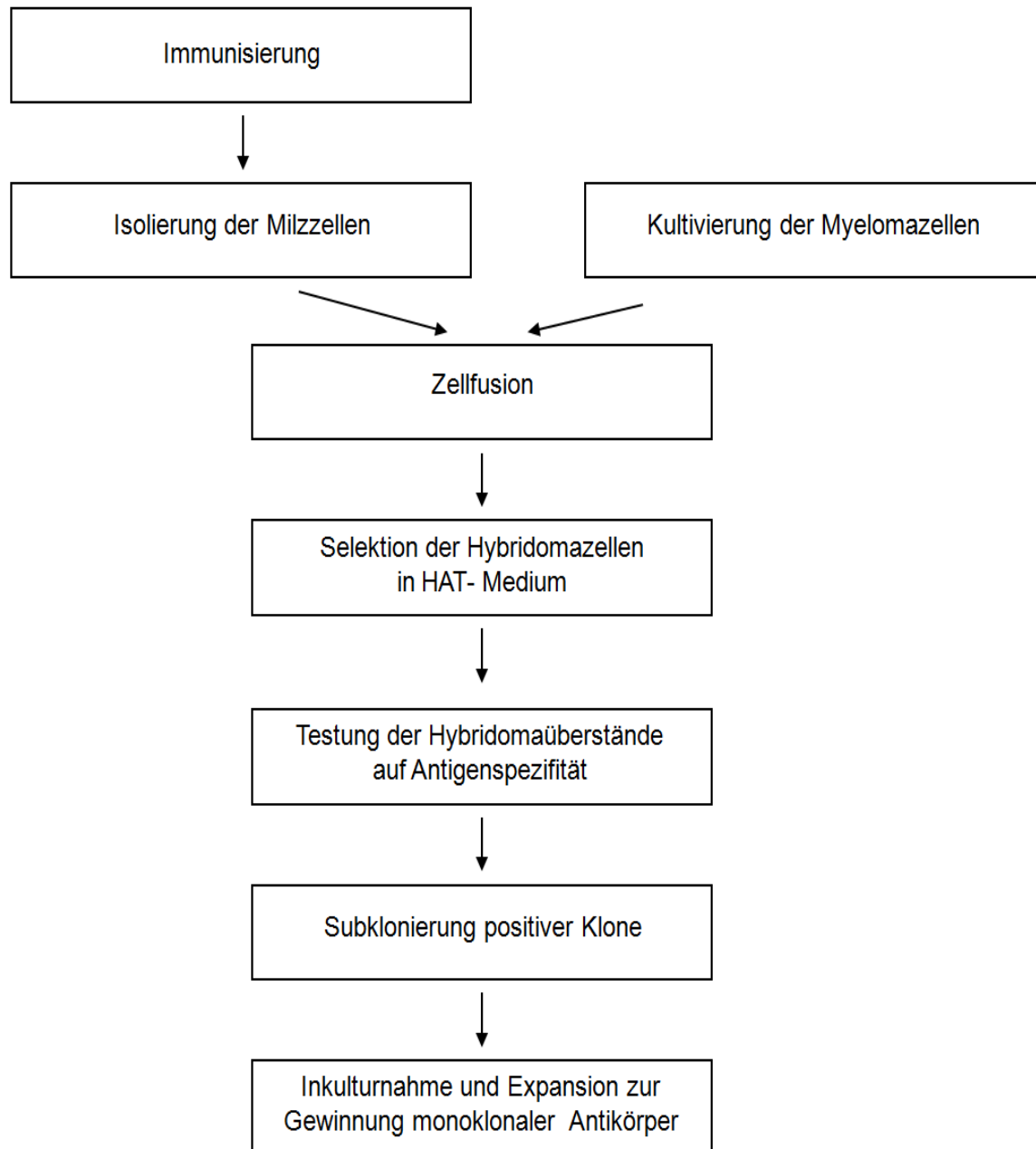
Da aus der Literatur bekannt ist, dass die Expression des mTNFR2 auf T-Lymphozyten mit Hilfe von gegen die T-Zell-Rezeptoren gerichteten Antikörpern stimuliert werden kann (Chen et al., 2007; Kim und Teh, 2004), wurden die aus der Milz und dem Thymus gewonnenen Zellen über 48 h stimuliert. Dazu wurde eine 24-Well Mikrotiterplatte pro Well mit 1 ml einer  $\alpha$ -CD3-Antikörperlösung (2 µg/ml in 50 mM TRIS-Puffer, pH 8,8) befüllt und über Nacht im Zellinkubator gelagert. Nach Absaugen der Lösung wurden die Zellen mit einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen pro Well auf die mit  $\alpha$ -CD3-Antikörper beschichtete Platte gegeben und in jedem Well mit 1 ml des löslichen  $\alpha$ -Mouse-CD28-Antikörpers (2 µg/ml in RPMI-Medium) für 48 h bei 37 °C stimuliert. Danach wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber in

Suspension gebracht, mit einer Pipette in ein 15 ml Falcon überführt und bei 300 g für 10 min zur weiteren Verwendung pelletiert.

## **2.2.2 Herstellung monoklonaler m- $\alpha$ -mTNFR2-Antikörper**

### **2.2.2.1 Überblick über die Hybridomatechnik**

Zur Herstellung der monoklonalen Antikörper wurden die TNFR2-defizienten Mäuse mit dem Antigen (mTNFR2-V5-His) immunisiert. Im Zuge der adaptiven Immunantwort, die zu einer Antigen-induzierten Aktivierung und Expansion der spezifischen antikörperproduzierenden B-Lymphozyten führt, kommt es zu einer Anreicherung dieser Zellen in der Milz. Durch die Isolierung der immunkompetenten B-Lymphozyten aus der Milz und der Fusion mit den Myelomazellen entstehen die Hybridomazellen, die die Eigenschaften ihrer Ursprungszellen vereinen. Unbegrenztes Wachstum, sowie die stetige Produktion von Antikörpern. Die Selektion und Expansion einer geeigneten Hybridomazelllinie, die spezifische, gegen das gewünschte Epitop gerichtete Antikörper produziert, ist dann der nächste Schritt in der Herstellung des monoklonalen Antikörpers. Der Zellüberstand mit den entsprechenden Antikörpern kann regelmäßig geerntet, aufgereinigt und für die weitere Charakterisierung des Antikörpers in verschiedenen Verfahren eingesetzt werden (Abb. 8).



**Abbildung 8: Überblicksschema zur Herstellung monoklonaler Antikörper nach der Hybridomatechnik.**

Nach der Immunisierung der Maus mit dem Antigen wird die mit B-Lymphozyten angereicherte Milz entnommen. Die Zellfusion erfolgt mit immortalisierten Myelomazellen. Eine Selektion fusionierter Hybridomazellen erfolgt in HAT-Medium. Nach Testung der Hybridomaüberstände auf ihre spezifische Antikörperproduktion, werden die positiven Klone weiter subkloniert. Monoklonale Hybridomazellen werden in Kultur genommen und weiter expandiert. Aus den Überständen können die monoklonalen Antikörper gewonnen und aufgereinigt werden.

### 2.2.2.2 Immunisierung der Mäuse

Zur Generierung der Maus- $\alpha$ -mTNFR2-Antikörper wurden drei acht Wochen alte weibliche C57BL/6 Mäuse (FA-R, FA-L, FA-O) verwendet, die aufgrund einer genetischen Manipulation für den mTNFR2-Rezeptor (mTNFR2<sup>-/-</sup>) defizient sind.

Dazu wurde den Mäusen jeweils 100  $\mu$ g des Immunisierungsproteins mTNFR2-V5-His (100  $\mu$ l der Konzentration 1 mg/ml) in 100  $\mu$ l kompletten Freund's Adjuvans (*Complete Freund's Adjuvant*, CFA) intraperitoneal (i.p.) injiziert (Injektionsvolumen 200  $\mu$ l total). Durch die Zugabe des Adjuvans, das hitzeinaktivierte Erreger (*Mycobacterium tuberculosis*) enthält, sollte die Immunreaktion verstärkt werden.

Der erste Boost fand an Tag 21 mit 100  $\mu$ g des mTNFR2-V5-His-Proteins in 100  $\mu$ l inkompletten Freund's Adjuvans (*Incomplete Freund's Adjuvant*, ICFA) i.p. statt.

Am Tag 47 erfolgte der 2. Boost mit der gleichen Menge an mTNFR2-V5-His, das jedoch ohne Zugabe eines Adjuvans in 100  $\mu$ l PBS aufgenommen und i.p. appliziert wurde (Tab. 10). Drei Tage nach dem letzten Boost erfolgte die Fusion der Milzzellen mit den Myelomazellen.

**Tabelle 10: Immunisierungsschema der mTNFR2<sup>-/-</sup> Mäuse.**

	Tag	Protein	Adjuvans	Applikationsart
Immunisierung	0	100 $\mu$ g mTNFR2-V5-HIS	100 $\mu$ l CFA	i.p.
1. Boost	21	100 $\mu$ g mTNFR2-V5-HIS	100 $\mu$ l ICFA	i.p.
2. Boost	47	100 $\mu$ g mTNFR2-V5-HIS	100 $\mu$ l PBS	i.p.
Milzentnahme	3 Tage nach dem letzten Boost			

### 2.2.2.3 Gewinnung und Aufbereitung der Mäuseseren zur Titerbestimmung

Drei Tage nach dem ersten bzw. nach dem zweiten Boost wurde den immunisierten Mäusen mittels Punktion der Schwanzvene (1. Boost) oder aus dem retroorbitalen Venenplexus (2.Boost) Vollblut entnommen. Dieses wurde für eine Stunde bei RT und anschließend über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert, um eine vollständige Blutgerinnung herbeizuführen. Am Folgetag wurden die zellulären Bestandteile durch Zentrifugation bei 300 g vom Serum getrennt, der Überstand abgenommen und bei -20 °C für die spätere Titerbestimmung aufbewahrt.

### 2.2.2.4 Kultivierung der Myelomazellen für die Fusion

Die Zellfusion wurde mit der Maus- Myelomazelllinie SP2/0-Ag14 durchgeführt.

Da dieser Zelllinie das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT<sup>-</sup>) fehlt, wachsen unfusionierte Zellen in einem Hypoxanthin-, Aminopterin- und Thymidin-haltigen Medium (HAT) nicht, was zur Selektion fusionierter Hybridomazellen dient.

Die Zellen wurden in dem in Tabelle 8 aufgeführten Medien kultiviert und in der angegebenen Frequenz regelmäßig gesplittet.

#### **2.2.2.5 Gewinnung von Peritonealexudatzellen (PEC)**

Für die Isolierung der PEC wurden weibliche NMRI Mäuse im Alter von 8-12 Wochen verwendet. Die PEC dienten in der Kultur mit Hybridomazellen dazu, ein konditioniertes Medium zu erzeugen und Zelldebris durch Phagozytose zu beseitigen.

Am Abend vor der geplanten PEC-Isolierung wurde jeder Maus 1 ml eines sterilen, eiskalten PBS i.p. injiziert. 12-16 Stunden nach der Injektion wurden die Mäuse durch Genickzug getötet und mit Ethanol (70 %) benetzt. Das Fell wurde am Unterbauch eingeritzt und durch gegenläufiges Ziehen vom Rumpf abpräpariert. Zur Gewinnung der Peritonealmakrophagen wurden 10 ml eines eiskalten Standardmediums mit einer Kanüle in die Bauchhöhle gespritzt und anschließend möglichst vollständig wieder abgesaugt. Nach Überführung in ein 50 ml Falcon und Zentrifugation bei 300 g für 7 min wurde der Überstand abgesaugt. In einem weiteren Waschschrift wurde das Pellet erneut in 50 ml frischem Medium suspendiert, abzentrifugiert und die Zellzahl bestimmt. Die PEC wurden mit einer Anzahl von  $2 \times 10^4$  pro Well in 100 µl Standardmedium auf die 96-Well Mikrotiterplatten ausgesät und am darauf folgenden Tag auf Kontamination überprüft.

#### **2.2.2.6 Isolierung der Milzzellen für die Zellfusion**

Am 3. Tag nach dem zweiten Boost wurde die im ELISA-Verfahren (2.2.3.3) ermittelte titerstärkste Maus durch Genickzug getötet. Die Gewinnung der Milzzellen erfolgte nach dem in 2.2.1.5 beschriebenen Verfahren.

#### **2.2.2.7 Zellfusion**

Nach zweimaligem Waschen der Maus-Myelomazelllinie SP2/0-Ag14 in serumfreien RPMI-Medium und Bestimmung der Lebendzellzahl fand die Fusion mit den aufbereiteten B-Zellen der Milz statt. Dazu wurden die Myelomazellen mit den Milzzellen im Verhältnis 1:3 in ein 50 ml Falcon gegeben und bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde vollständig abgesaugt und das Zellpellet für 1 Minute bei 37 °C im Wasserbad erwärmt. Anschließend wurde 1 ml des auf 37 °C angewärmten Polyethylenglycol (PEG) zugegeben und für eine weitere Minute unter Drehen des Falconröhrchens im Wasserbad belassen. Um das PEG auszuverdünnen, wurden dann über einen Zeitraum von 5 min tropfenweise insgesamt 10 ml eines vortemperierten, serumfreien RPMI-Medium zugegeben und das Zellpellet unter vorsichtigem Anklopfen des Falconendes gelockert.

Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 150 ml HAT-Medium resuspendiert. Die Ausbringung der Zellen erfolgte mit 100 µl pro Well auf den mit PEC-beschichteten Mikrotiterplatten.

Als Sterbekontrolle wurden in einigen Wells unfusionierte Myelomazellen ausgesät.

#### **2.2.2.8 Kultivierung von Hybridomazellen und Subklonierung**

Da den verwendeten Myelomazellen das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase fehlt (HGPRT<sup>-</sup>), weisen diese einen Defekt im Reservestoffwechselweg der Nukleinsäuresynthese auf. Durch eine zusätzliche Blockade der Neusynthese der Nukleinsäuren durch das zugegebene Aminopterin im HAT-Medium können unfusionierte Myelomazellen nicht überleben. Nur fusionierte Zellen erhalten von den B-Zellen das HGPRT-Enzym und damit auch die Fähigkeit zur Nukleotidbiosynthese über den Reservestoffwechselweg. Damit überleben nur die fusionierten Myelomazellen im Selektionsmedium, die nun die Eigenschaft der unbegrenzten Teilungsfähigkeit besitzen und dauerhaft kultiviert werden können.

Die Hybridomazellen wurden schrittweise von HAT-Medium in HT-Medium und schließlich in Standardmedium überführt. Dies erfolgte, indem das für die Antikörpertestung entnommene Medium zunächst mit HT-Medium wieder auf das ursprüngliche Gesamtvolumen von 200 µl pro Well aufgefüllt wurde. Damit wurde der Anteil an HAT-Medium stetig reduziert. Nach dem vollständigen Transfer der Zellen in HT-Medium erfolgte die Überführung in Standardmedium nach identischem Verfahren.

Das Wachstum der Zellkolonien, sowie deren Morphologie wurden täglich lichtmikroskopisch überprüft. Eine Testung der Hybridomaüberstände auf eine spezifische Antikörperproduktion erfolgte erstmals 10 Tage nach der Zellfusion und anschliessend alle zwei Tage nach dem in Kap. 2.2.3.4 beschriebenen ELISA-Verfahren.

Diejenigen Wells, die als positiv getestet wurden und nur eine Zellkolonie enthielten, wurden als potentiell monoklonal gesondert markiert und auf einer neuen, mit PEC-beschichteten Mikrotiterplatte nach dem Prinzip der limitierten Verdünnung weiter subkloniert.

Dazu wurde ein Teil der Zellen geerntet, gezählt und mit einer statistischen Zelldichte von einer Zelle pro Kavität ausgesät. Die Antikörperproduktion der heranwachsenden Klone wurde dann erneut im ELISA-Verfahren überprüft. Waren alle Wells der Subklonierung positiv, wurde der Mutterklon als monoklonal erachtet, andernfalls schloss sich eine weitere Subklonierung an.

Um das Wachstum der Zellklone zu sichern, wurden dicht bewachsene Wells im Verhältnis 1:2 auf neue Mikrotiterplatten gesplittet. Ein Zellstock an positiv getesteten Hybridomazellen wurde als Sicherheitsreserve in regelmäßigen Abständen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

#### **2.2.2.9 Herstellung der Hybridomaüberstände**

Zur Gewinnung größerer Mengen an Antikörper-haltigem Überstand wurden die Hybridomazellen auf mehrere 750 ml Zellkulturflaschen expandiert, die zuvor mit Peritonealmakrophagen beimpft wurden. Dies war notwendig, da die Hybridomazellen nur in Anwesenheit der PEC zu kultivieren waren und in Abwesenheit der sogenannten „Feeder-Zellen“ nach wenigen Tagen abstarben. Die Hybridomaüberstände wurden in regelmäßigen Abständen auf ihre Antikörperproduktion hin überprüft.

Die Ernte des Zellmediums erfolgte an jedem zweiten Tag durch Überführung der Zellsuspension in ein 50 ml Falcon und Zentrifugation bei 300 g für 5 min. Nach Abnahme des Überstands mit einer sterilen Pipette wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in die Zellkulturflasche zurück gegeben. Der gewonnene Überstand wurde durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (300 g, 10 min) und der Sterilfiltration (Porengröße Filter 0,80 µm) von noch enthaltenem Zelldebris befreit. Die Lagerung des Überstands bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei 4 °C.

#### **2.2.2.10 Aufreinigung der Antikörper mittels Protein G Sepharose-Säule**

Zur Isolierung der monoklonalen Antikörper aus dem Zellkulturüberstand wurde die HiTrap Protein G HP- Säule (Bio Rad, GE Healthcare GmbH) verwendet. Dabei handelt es sich um ein bakterielles Oberflächenprotein aus Streptokokken der Gruppe G, das eine hohe Affinität zur Fc-Region der Immunglobuline besitzt. Die Bindungsaffinität der verschiedenen Immunglobulin-Subklassen ist pH-abhängig und führt daher zu einer reversiblen Interaktion mit der Trägermatrix. Eine Antikörperbindung an den Fc-Rezeptor der Säule kann daher durch eine pH-Änderung unter sauren Bedingungen wieder aufgehoben werden.



Zunächst wurde die Protein G-Säule mit 10 ml PBS äquilibriert. Der Probenauftrag erfolgte bei 4 °C mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,8 ml/min, wobei stets darauf geachtet wurde, dass keine Luft auf die Säule gepumpt wurde und die Säule nicht trocken lief. Die Säule wurde dann an ein Photometer angeschlossen und solange mit PBS gewaschen, bis die Absorption wieder den PBS-Wert erreichte. Der an die Matrix gebundene Antikörper wurde mit 0,1 M Glyzin-HCl-Puffer (pH 3,1) eluiert und in 1 ml Fraktionen portioniert. Um eine Denaturierung der Immunglobuline zu verhindern, wurden alle Aliquots sofort mit Tris Base (1 M, pH 11) auf pH 7 neutralisiert. Die eluierten Fraktionen wurden über 24 Stunden zweimal gegen PBS dialysiert, aliquotiert und zur weiteren Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

#### **2.2.2.11 Subklassentest des monoklonalen Antikörpers**

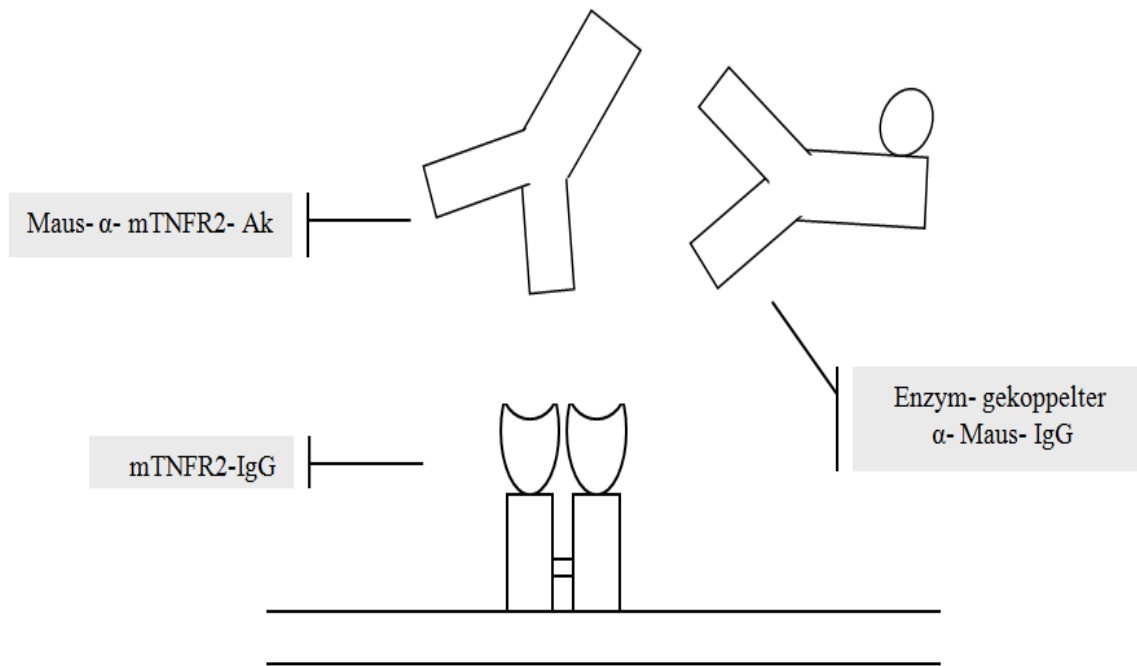
Die Subklasse des aufgereinigten Antikörpers wurde mit Hilfe des *mouse monoclonal antibody isotyping Test Kit* der Firma Serotec bestimmt.

Die Teststreifen enthalten gegen die verschiedenen Subklassen gerichtete immobilisierte Banden an  $\alpha$ -Maus-Antikörper, die dann an das entsprechende Immunglobulin binden können. Der Teststreifen wurde dazu in ein mit Hybridomaüberstand gefülltes Röhrchen gehalten, bis sich die Kontrollbande blau anfärbte. Eine Bindung des zu testenden Immunglobulins an den Teststreifen führte dann zum Auftauchen einer für die Klasse und Subklasse des Antikörpers spezifischen Bandenfärbung.

### **2.2.3 Der „Enzyme-linked Immunosorbent-Assay“**

#### **2.2.3.1 Überblick über das ELISA-Verfahren**

Der sogenannte *Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay* (ELISA) bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, das an eine enzymatisch katalysierte Farbreaktion gekoppelt ist. Nach der Auftragung der Probe binden nur die spezifischen Antikörper an das immobilisierte Antigen der Mikrotiterplatte. Durch die Zugabe eines enzymgekoppelten Sekundärantikörpers (*detection*-Antikörper), der ebenfalls spezifisch an die nachzuweisenden Antikörper bindet, wird nach Zugabe des enzymspezifischen Substrats eine Farbreaktion katalysiert. Die Intensität dieser Farbreaktion steigt dabei mit der an die ELISA-Platte gebundenen Antikörpermengende und kann photometrisch im ELISA-Reader ermittelt werden.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung des ELISA-Verfahrens zum Nachweis von Maus- $\alpha$ -mTNFR2-Antikörpern.**

Das rekombinant hergestellte Protein mTNFR2-IgG wurde als Antigen an die ELISA-Platte immobilisiert. Daran gebundene m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak wurden durch einen Enzym-gekoppelten  $\alpha$ -Maus-IgG-Antikörper nachgewiesen, der nach Zugabe eines Substrats eine photometrisch messbare Farbreaktion katalysiert.

### **2.2.3.2 Herstellung der mit dem mTNFR2-Protein beschichteten ELISA-Platten**

Zur Bestimmung des Antikörpertiters immunisierter Mäuse und zur Testung der Hybridomaüberstände wurde das mTNFR2-IgG Protein auf die 96-Well ELISA-Platten immobilisiert. Um Kreuzreaktivitäten der Antikörper mit dem zur Immunsierung verwendeten Protein auszuschließen, diente für den Nachweis spezifischer Antikörper ein mTNFR2-Protein, das sich durch das IgG-tag von dem Immunsierungsprotein unterscheidet.

Die Beschichtung der ELISA-Platten erfolgte durch Auftragung von 100  $\mu$ l/Well des mTNFR2-IgG-Antigens (Konzentration 2  $\mu$ g/ml in PBS), was einer Proteinmenge von 0,2  $\mu$ g/Well entsprach. Nach Inkubation der ELISA Platten bei 4 °C über Nacht, wurden die Platten dreimal mit TBS-Tween® (300  $\mu$ l pro Well) gewaschen und nach jedem Waschschrift sorgfältig trocken geklopft. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden pro Well 300  $\mu$ l einer Blockierlösung (10 % [w/v] Milchpulverlösung in TBS) aufgetragen. Nach einer weiteren Inkubation über Nacht bei 4 °C und dem darauf folgenden Waschschrift (3x TBS-

Tween®) wurden die Platten entweder in Frischhaltefolie gehüllt und bei -20 °C für den späteren Gebrauch eingefroren, oder unmittelbar für die Antikörpertestung verwendet.

Die Herstellung der ELISA-Platten zur Testung kreuzreaktiver Eigenschaften erfolgte nach identischem Verfahren, wobei 0,2 µg des mTNFR2-V5-His Proteins an die ELISA-Platten immobilisiert wurden.

### **2.2.3.3 ELISA zur Bestimmung der Immunglobulintiter der Mäuseseren**

Zur Quantifizierung der Antikörperproduktion der immunisierten Mäuse wurden die gewonnenen Seren 1:200 in PBS vorverdünnt.

Die Auftragung erfolgte in Duplikaten mit 100 µl pro Well in einer logarithmischen Verdünnungsreihe. Als Positivkontrolle diente das Serum einer aus einer früheren Immunisierung stammenden und bereits als positiv getesteten Maus (Serumkonzentration  $1 \times 10^5$  in TBS). Zur Negativkontrolle wurde das Serum einer unbehandelten mTNFR2<sup>-/-</sup> Maus verwendet. Ferner wurde auf jeder ELISA-Platte ein Leerwert mitgeführt, bei dem in ein Well 100 µl PBS aufgetragen wurde. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei RT wurden die Mikrotiterplatten nach dem bereits in 2.2.3.2 beschriebenen Verfahren gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe des Detektionsantikörper  $\alpha$ -Mouse-IgG ( *$\gamma$ -chain specific*) -AP in der Konzentration 1:5000 in einer 0,5 % (w/v) Milchpulverlösung mit 100 µl/Well. Nicht gebundene Antikörper wurden nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei RT durch dreimaliges Waschen mit TBS-Tween® entfernt. Nach Zugabe des Substrats (100 µl eines 0,1 % [w/v] 4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz in Substratpuffer) konnte im Falle gebundener Sekundärantikörper eine Farbreaktion beobachtet werden. Nach einer Entwicklungsdauer von 15 min bei RT und Dunkelheit wurde die Reaktion mit 50 µl/Well einer 3 M NaOH-Lösung abgestoppt und die Absorption im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt.

Ein positiver Titer wurde definiert als diejenige Verdünnung von Antikörpern, bei der die Extinktion über dem doppelten Extinktionswert der Negativkontrolle lag.

### **2.2.3.4 ELISA zur Testung der Hybridomaüberstände auf eine spezifische Antikörperproduktion**

Zum Screening der Hybridomaüberstände wurde im Wesentlichen das bereits in Kap. 2.2.3.3 beschriebene ELISA-Verfahren angewandt. Anstelle der Serumproben wurden hierbei jedoch 100 µl der zu testenden Hybridomaüberstände steril aus dem Well entnommen und direkt auf

die ELISA-Testplatte gegeben. Als Positivkontrolle wurde 100 µl des positiven Mausserums eingesetzt, als Negativkontrolle dienten 100 µl eines Überstands, der von einer als negativ geltenden Hybridomazelllinie stammte.

## **2.2.4 Proteinchemische Methoden**

### **2.2.4.1 Dot-Blot-Verfahren und Proteindetektion**

Um zu überprüfen, ob das rekombinant hergestellte Protein mTNFR2-IgG zum Nachweis des monoklonalen Antikörpers im Western Blot geeignet ist, wurden 1 µl des Proteins in unterschiedlichen Konzentrationen sowohl in nativer, als auch in denaturierter Form direkt auf eine Nitrozellulosemembranen gegeben. Die Denaturierung des Proteins erfolgte zuvor in einem Eppendorfgefäß durch die Zugabe eines 4 x Lämmli-Puffers und der Inkubation im Thermoblock (5 min, 95 °C). Zur Positivkontrolle wurde 1 µl des Serums einer titerpositiven Maus direkt auf die Membran gegeben. Als Negativkontrolle diente 1 µl BSA (Konzentration 1 µg/µl in PBS). Nach dem Antrocknen der aufgetragenen Proteine wurden die Membranen mit Blockierlösung über Nacht bei 4 °C gelagert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-Tween® wurden die Membranen einzeln mit dem zu testenden Hybridomaüberstand übergossen und für weitere 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (3 x in TBS-Tween®) wurden an die Membran gebundene Antikörper durch die Zugabe eines Peroxidase (POX)-gekoppelten α-Mouse-IgG-Sekundärantikörpers (Konzentration 1:5000 in 0,5 % [w/v] Milchpulverlösung) detektiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei RT und einem erneuten Waschschrift erfolgte die Entwicklung des Chemielumineszenzfarbstoffes in einem abgedunkelten Raum. Dazu wurden die beiden Entwicklerlösungen nach Angaben des Herstellers im Verhältnis 1:1 gemischt und über die Blotmembranen gegeben. Nach ca. 1 Minute wurden die Membranen mit einer Pinzette aufgegriffen und für wenige Sekunden bis zu 5 min auf einen Röntgenfilm (FUJI Medical X-Ray) in die Röntgenkassette gelegt. Das Entwickeln des Films erfolgte im Optimax X-RAY Film Processor.

### **2.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dabei wandern die zu untersuchenden Moleküle in einem elektrischen Feld durch eine Gelmatrix, die durch Quervernetzung der Polyacrylamid-Ketten gebildet wird. Bei Natriumdodecylsulfat (SDS) handelt es sich um ein anionisches

Tensid, das sich an die hydrophoben Regionen der Proteine anlagert und diese denaturiert. Die resultierenden Komplexe erhalten durch die Sulfatgruppen eine gleichmäßig verteilte negative Ladung. Damit ist die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel allein von der relativen Molekülmasse abhängig.

Die Gele wurden gemäß folgender Tabelle angesetzt und zwischen zwei abgedichtete Gelelektrophorese Apparaturen (Bio-Rad) gegossen, die durch einen Abstandhalter (1,5 mm) voneinander getrennt waren.

**Tabelle 11: Zusammensetzung eines SDS-Gels**

Lösungen	Trenngel 12,5 %	Sammelgel 3 %
Acrylamid Stammlösung	6,25 ml	0,85 ml
Tris pH 6,8	0 ml	1,5 ml
Tris pH 8,8	3,75ml	0 ml
H <sub>2</sub> O bidest.	5 ml	3,75 ml
10 % SDS	150 µl	60 µl
TEMED ( Katalysator)	10 µl	5 µl
10 % APS (Radikalstarter)	100 µl	50 µl

Um eine glatte Gelgrenze zu erhalten und den Kontakt des Gels mit Sauerstoff zu vermeiden, wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet, das jedoch nach der Polymerisationszeit von 30 min wieder entfernt wurde. In einem weiteren Schritt wurde dann das Sammelgel darüber gegossen, wobei vor dessen Polymerisation ein Kamm zur Ausbildung von 10 Probestaschen eingesetzt wurde.

Die Beladung der Taschen erfolgte mit jeweils 1,5 µg an mTNFR2-IgG bzw. mTNFR2-V5-His-Protein. Beide rekombinanten Proteine wurden zuvor durch Zugabe von 4 x Lämmli-Puffer und Erhitzung im Thermoblock (5 min, 95 °C) denaturiert. In die erste Tasche des Gels wurden 10 µl eines Molekulargewichtsstandard (Protein Standard All Blue, Bio Rad) gefüllt. Dieser enthält Proteine bekannter Größe und ermöglicht damit ein Ablesen der Molekülgröße der aufgetrennten Proben. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 0,2 V und einer Stromstärke von 50 mA pro Gel bis die durch Bromphenolblau markierte Lauffront das Gelende erreicht hatte.

#### **2.2.4.3 Coomassie-Färbung**

Die Färbung der SDS-Polyacrylamidgele erfolgte über Nacht bei RT in Coomassie-Brilliant-Blue-Färbelösung. Die Hintergrundfärbung der Gele wurde durch mehrfaches Einlegen in

Entfärbelösung entfernt. Zum Trocknen der Gele wurden diese auf Filterpapier gegeben und im Gelrockner für etwa 1 Stunde getrocknet.

#### 2.2.4.4 Western Blot-Verfahren

Mittels des Western Blot-Verfahrens konnten die durch SDS-PAGE aufgetrennten und stark negativ geladenen Proteine in einem elektrischen Feld aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden. Dazu wurden zunächst drei Lagen der mit Transferpuffer beschichteten Filterpapiere in die Blot-Kassette eingelegt. Als nächste Lage diente das vom Sammelgel befreite Trenngel. Darauf wurde die PVDF-Membran gelegt, die zuvor in Methanol, dann in aqua bidest. und schließlich in Transferpuffer getaucht wurde. Die Membran wurde mit drei weiteren Lagen des feuchten Filterpapiers luftblasenfrei bedeckt. Das Semidry-Blotting erfolgte bei 0,2 V für 70 min bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche. Im Anschluss daran wurden die Membranen über Nacht in Blockierlösung gegeben. Nach dreimaligem Waschen der Membranen mit TBS-Tween® erfolgte die Zugabe der Primärantikörper nach dem in Tabelle 12 angegebenen Schema. Die Antikörper wurden in der Konzentration 1:5000, der Hybridomaüberstand in der Konzentration 1:2 in 0,5 % (w/v) Milchpulverlösung eingesetzt.

Membran Nr.1 konnte aufgrund der direkt an den Antikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase (HRP) nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei RT nach dem in Kap. 2.2.4.1 beschriebenen Verfahren auf einem Röntgenfilm entwickelt werden.

Die Membranen Nr.2 und Nr.3 wurden nach der Inkubation über Nacht bei 4°C und dem dreimaligen Waschen in TBS-Tween® mit dem Sekundärantikörper (Konzentration 1:5000 in 0,5 % [w/v] Milchpulverlösung) übergossen (Abb.12). Nach 2 Stunden Inkubation und einem weiteren Waschschrift wurden die Membranen auf einem Röntgenfilm entwickelt.

**Tabelle 12: Überblick über die im Western Blot eingesetzten Antikörper.**

Membran	Primärantikörper	Sekundärantikörper
1	Donkey- $\alpha$ -human-IgG-HRP	
2	$\alpha$ -Penta-His-IgG	$\alpha$ -Mouse-IgG ( <i>whole molecule</i> )-POX
3	Maus- $\alpha$ -mTNFR2-Ak (Hybridomaüberstand)	$\alpha$ -Mouse-IgG ( <i>whole molecule</i> )-POX

## **2.2.5 TNF-Bioassays zur funktionellen Charakterisierung des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak**

Bioassays dienen als zellbiologische Testsysteme, in denen der Effekt biologisch aktiver Zytokine auf den dafür sensiblen Zellen messbar gemacht wird. Zur Durchführung dieser zytokinabhängigen Bioassays werden Zelllinien verwendet, die ein Faktor-abhängiges Zellwachstum zeigen oder auf die Zugabe eines bestimmten Zytokins hin eine zellspezifische Reaktion zeigen.

### **2.2.5.1 Testung kreuzreaktiver Eigenschaften im TNF-induzierten Zytotoxizitätsassay**

Im TNF-induzierten Zytotoxizitätsassay wurde die Maus-Fibrosarkomzelllinie L-929 verwendet, die auf ihrer Zelloberfläche den TNFR1, jedoch nicht den TNFR2 besitzt. Im Falle einer Aktivierung des TNFR1 werden apoptotische Signalkaskaden induziert, die zum Absterben der Zellen führen.

Um die durch TNF-induzierte Sterblichkeitsrate der L-929-Zellpopulation besser beurteilen zu können, wurde in einem Vorversuch das rekombinante humane TNF (hTNF) bzw. das Maus-TNF (mTNF) in verschiedenen Konzentrationen zu den Zellen gegeben.

Ein konfluenter Zellrasen wurde erhalten, indem pro Well  $2 \times 10^4$  der L-929-Zellen in 100  $\mu$ l Kulturmedium auf einer 96-Loch-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden. Am darauf folgenden Tag wurde das jeweilige TNF in einer log<sub>2</sub>-Verdünnungsreihe mit 100  $\mu$ l pro Well auf die Zellen gegeben. Dafür wurde Actinomycin-D-haltiges Medium verwendet (Endkonzentration Actinomycin im Well: 2  $\mu$ g/ml), das durch Interkalation auf Ebene der Transkription und Translation die weitere Proteinbiosynthese hemmt. Für die Todkontrolle wurde eine absolut toxische TNF-Menge von 2,5 ng/ml zu den Zellen gegeben. Als Lebendkontrolle dienten einige Wells, die kein TNF enthielten. Außerdem wurde eine Mediumkontrolle angelegt, die keine Zellen enthielt, mit der jedoch nach gleichem Schema verfahren wurde.

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden konnte die Stoffwechselaktivität der Zellen im MTT-Assay durch Zugabe von 10  $\mu$ l einer MTT-Stammlösung direkt sichtbar gemacht werden. Da nur lebende Zellen den wasserlöslichen Farbstoff aufnehmen und in die blau-violetten, wasserunlöslichen Formazan-Kristalle umwandeln, ist der Anteil an Farbkristallen direkt proportional zur Viabilität der Zellpopulation. Die Reaktion wurde nach 4 h durch die Zugabe von 70  $\mu$ l einer 20 % (w/v) SDS- Lösung abgestoppt um die Kristalle erneut in Lösung zu bringen. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 h konnte die Absorption mittels photometrischer Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 540 nm

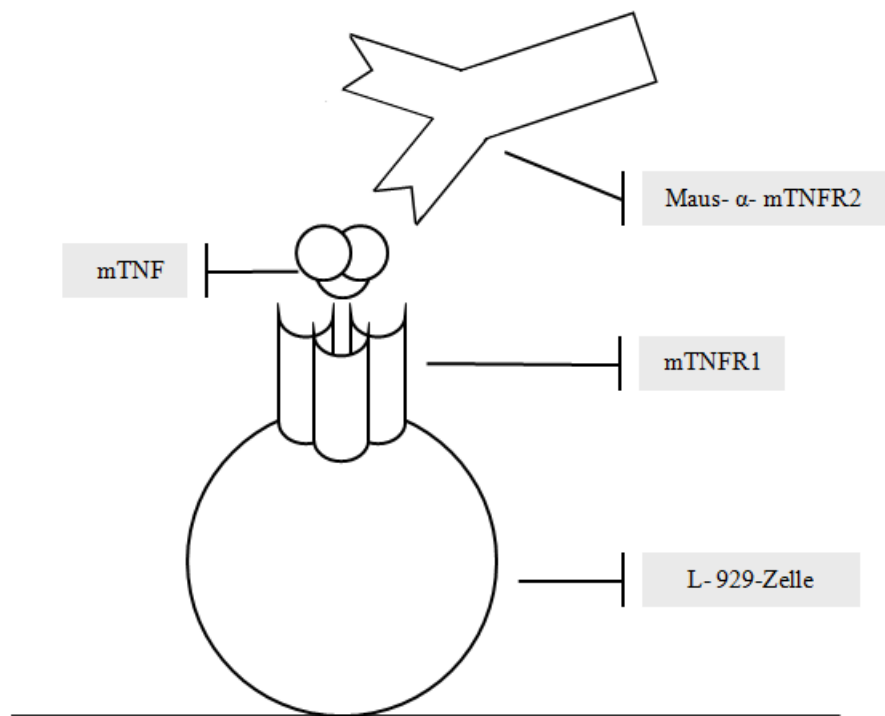
ermittelt werden. Die Viabilität der Zellen konnte dann mittels angegebener Formel (Formel 1) berechnet werden. Zusätzlich fand stets auch eine optische Beurteilung der Zellvitalität anhand zellmorphologischer Kriterien unter dem Lichtmikroskop statt.

**Formel 1: Berechnung der Viabilität im Zytotoxizitäts-Test**

$$\text{Viabilität im Loch y [\%]} = 100 \% \times (A_y - A_{\text{Mediumkontrolle}}) / (A_{100 \% \text{-Wert}} - A_{\text{Mediumkontrolle}})$$

Um zu untersuchen, ob der von den Hybridomazellen produzierte m- $\alpha$ -mTNFR2-Antikörper den mTNFR1 der L-929 Zellen aktiviert oder blockiert, wurde in einem weiteren Versuchsansatz pro Well 100  $\mu$ l des Hybridomaüberstands direkt auf die Zellen gegeben (Abb.10). Im Falle einer Aktivierung des mTNFR1 durch den Antikörper wäre eine vermehrte TNF-Bindung an den Rezeptor denkbar, was zu einer erhöhten Sterblichkeitsrate gegenüber der Kontrollpopulation (identische TNF-Menge, ohne Zugabe des Hybridomaüberstands) führen würde. Eine durch den Antikörper gehemmte TNF-Bindung an den mTNFR1 würde dagegen mit einer verringerten Sterblichkeitsrate im Vergleich zur Kontrollpopulation einhergehen. Um den Einfluss von im Medium angereicherten Stoffwechselprodukten auf die Zellsterblichkeit beurteilen zu können, wurden die Hybridomaüberstände in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt und dazu mit frischem Medium verdünnt (Verdünnungsstufen 1:2, 1:4, 1:8, 1:16). Als Vergleichskontrolle diente ein im ELISA als negativ getesteter Hybridomaüberstand, mit dem identisch verfahren wurde. Nach der Vorinkubation der Überstände mit den Zellen (2 h, 37 °C) wurde jedem Well 100  $\mu$ l an mTNF (Endkonzentration im Well 0,07 ng/ml) in Actinomycin-D-haltigem Medium (Endkonzentration im Well 2  $\mu$ g/ml) zugegeben. Zur Kontrolle des Zellwachstums in Abwesenheit des Antikörpers dienten Wells, denen kein Überstand, aber eine identische Menge an mTNF zugegeben wurde (Kontrollpopulation). Außerdem wurde das Zellwachstum in Abwesenheit von TNF in einigen TNF-freien Wells beobachtet. Die Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> gelagert und am folgenden Tag nach selbigen Verfahren im MTT-Assay entwickelt.





**Abbildung 10: Schematische Darstellung zur Testung kreuzreaktiver Eigenschaften des m- $\alpha$ -mTNFR2-AK mit dem mTNFR1 der L-929 Zelllinie.**

Durch die Zugabe von m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak zu den mit mTNF-inkubierten L-929-Zellen werden kreuzreaktive Eigenschaften des Antikörpers auf den mTNFR1 überprüft. Die über den mTNFR1 vermittelte TNF-induzierte Apoptoserate der Zellen würde im Falle aktivierender oder blockierender Eigenschaften des Antikörpers beeinflusst werden.

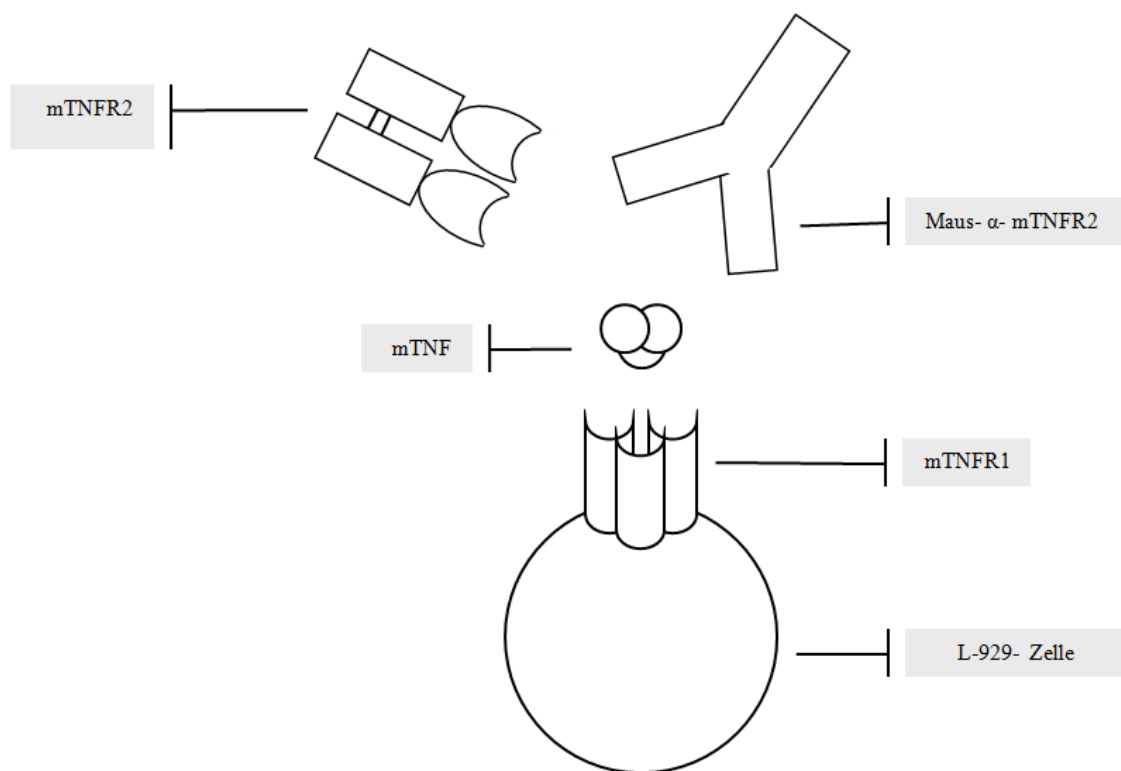
#### **2.2.5.2 Testung hemmender Eigenschaften im TNF-induzierten Zytotoxizitätsassay**

Durch eine Modifizierung des bereits in Kap. 2.2.5.1 beschriebenen TNF-Bioassays sollten die funktionellen Eigenschaften des monoklonalen Antikörpers weiter charakterisiert werden. In einem Vorversuch wurde durch die Zugabe des löslichen mTNFR2 untersucht, inwieweit durch die Neutralisation des toxischen TNF ein Schutz der L-929 Zellen vor dem Zytokin-induzierten Zelltod erreicht werden kann.

Dazu wurden die beiden rekombinanten Rezeptorproteine mTNFR2-V5-His und mTNFR2-IgG mit einer maximalen Konzentration von 1000 ng/ml in einer logarithmischen Verdünnungsreihe mit dem mTNF (Endkonzentration im Well 0,07 ng/ml) in Actinomycin-D-haltigem Medium (Endkonzentration im Well 2  $\mu$ g/ml) vorinkubiert (1 h, 37 °C). Nach Absaugen des Mediums von den am Vortag ausgesäten L-929-Zellen wurde der Rezeptor-TNF-Ansatz mit 100  $\mu$ l/Well auf die Zellen übertragen und für weitere 24 h bei 37 °C

gelagert. Die Auswertung des Versuchansatzes wurde nach dem bereits in Kap. 2.2.5.1 beschriebenen Verfahren im MTT-Assay ermittelt.

Um mögliche antagonistischer Eigenschaften des Antikörpers auf den mTNFR2 zu erkennen, wurde in einem weiteren Schritt der m- $\alpha$ -mTNFR2-AK gleichzeitig mit dem löslichen Rezeptor zu den mTNF-inkubierten Zellen gegeben (Abb. 11). Im Falle einer Antikörper-induzierten Rezeptorblockade würde dann die Fähigkeit zur TNF-Neutralisation durch den löslichen Rezeptor und damit ein Schutz der L-929 Zellen vor dem Zytokin-induzierten Zelltod, aufgehoben werden.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung zum Test blockierender Eigenschaften des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak auf den zugegebenen mTNFR2 im TNF-induzierten Zytotoxizitätstest mit L-929-Zellen.**

Durch eine Blockade des löslichen mTNFR2 -IgG durch den m- $\alpha$ -mTNFR2-Antikörper würde die schützende Wirkung des Rezeptors der Zellen vor dem mTNF-induzierten Zelltod aufgehoben werden.

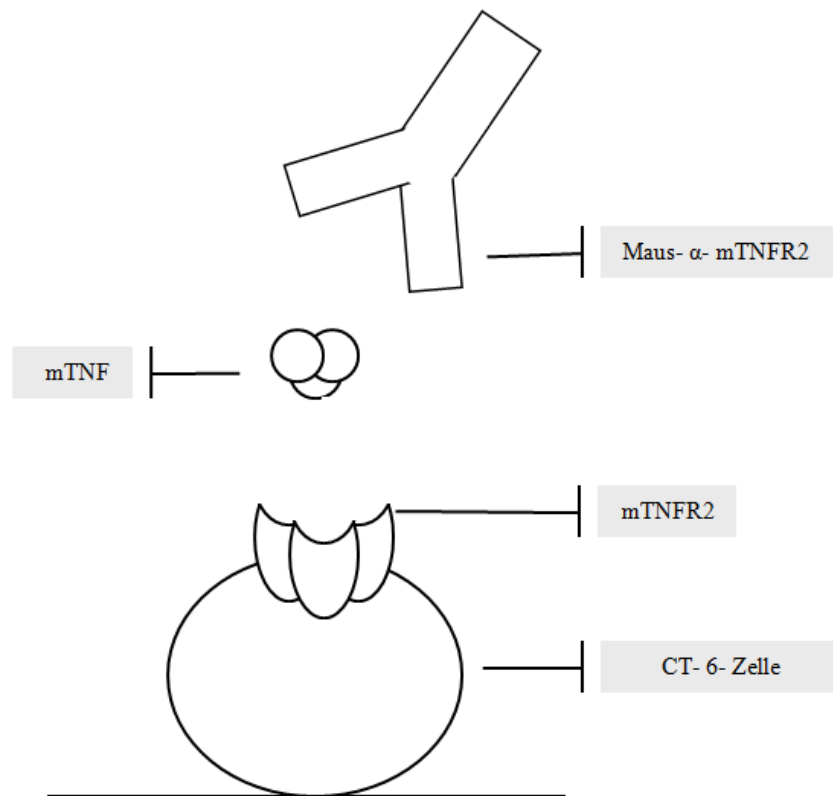
Im Versuchsansatz wurde dazu sowohl der aufgereinigte Antikörper (Eluat), als auch der von der Arbeitsgruppe hergestellte Aszites, der eine besonders hohe Antikörperkonzentration enthält, eingesetzt. Dazu wurden die Antikörper in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:20 und 1:40 in PBS) mit einer logarithmischen Verdünnungsreihe des TNFR2-IgG (max. Konzentration 500 ng/ml) vorinkubiert (2 h, 37 °C). Anschließend wurden 100  $\mu$ l des

Rezeptor-Antikörper-Ansatzes auf die Zellen pipettiert und weitere 100 µl des mTNF (Endkonzentration im Well 0,07 ng/ml) in Actinomycin-D-haltigem Medium (Endkonzentration im Well 2 µg/ml) zugegeben und für weitere 24 h bei 37 °C aufbewahrt. Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte nach dem in Kap. 2.2.5.1 beschriebenen MTT-Verfahren.

### **2.2.5.3 Testung aktivierender und hemmender Eigenschaften im Bioassay mit der cytotoxischen CT-6-Zelllinie**

In diesem Bioassay wurde die cytotoxische Maus-T-Zelllinie CT-6 verwendet, deren Proliferationsrate über die TNF-induzierte Aktivierung des membranständigen mTNFR2-Rezeptors gesteigert werden kann (Ameloot et al., 2001; Sheehan et al., 1995; Tartaglia et al., 1991). Das Zytokin-abhängige Wachstum der CT-6 Zellen wurde zunächst in einem Vorversuch durch eine logarithmisch angelegte TNF-Titration überprüft. Dazu wurden die Zellen mit einer Anzahl von  $5 \times 10^4$  pro Well in 100 µl eines IL-2- haltigen Mediums (100 U/ml) auf einer 96-Well Mikrotiterplatte ausgesät und mit einer log<sub>2</sub>-Verdünnungsreihe des mTNF für 48 h inkubiert. Zur Wachstumskontrolle wurden Zellen in Abwesenheit von mTNF kultiviert. Die Proliferationssteigerung wurde mittels MTT-Assay und über eine Absorptionsmessung photometrisch ermittelt.

Zur Testung blockierender Eigenschaften des monoklonalen Antikörpers auf den zellständigen mTNFR2 der Zellen wurden diese in einem weiteren Versuchsansatz zeitgleich mit dem mTNF und dem m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak versetzt (Abb. 12). Im Falle einer Antikörper-induzierten Blockade des Rezeptors wäre der Proliferationsstimulus der Zellen im Vergleich zur Kontrollpopulation (identischen Menge an mTNF, kein m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak) erniedrigt.

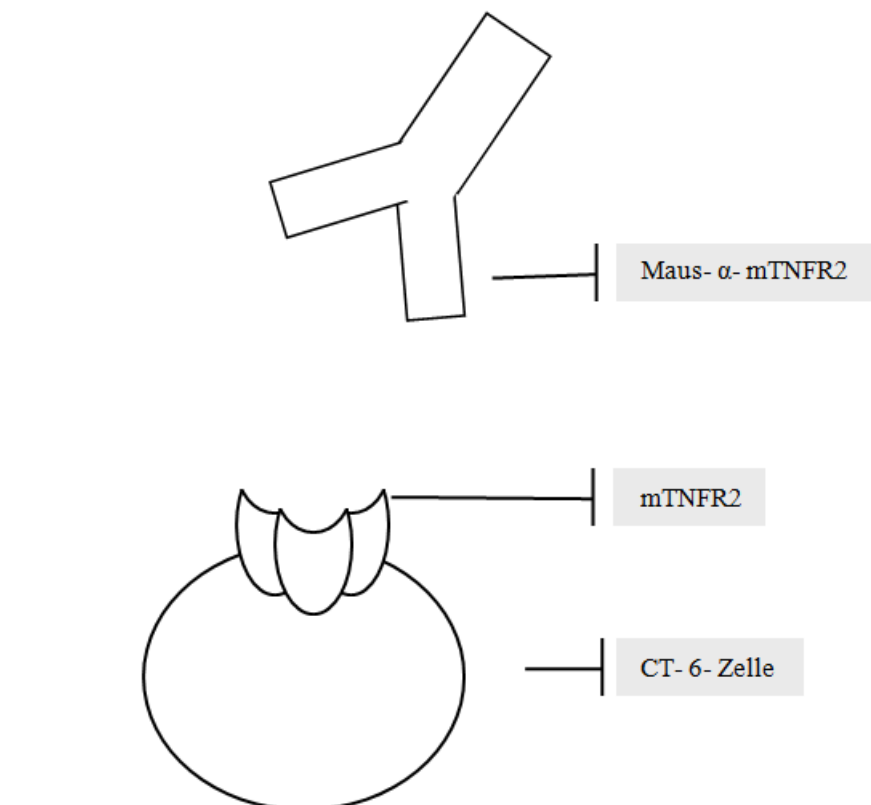


**Abbildung 12: Schematische Darstellung des Bioassays zur Testung blockierende Eigenschaften des m- $\alpha$ -mTNFR2 auf den zellständigen mTNFR2.**

Im Falle antagonistischer Eigenschaften des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak auf den mTNFR2 der CT-6 Zellen würde die Bindung des mTNF an den Rezeptor verhindert werden.

Die CT-6 Zellen wurden dazu mit  $5 \times 10^4$  Zellen pro Well in 100  $\mu$ l eines IL-2-haltigen Mediums auf einer 96-Well Mikrotiterplatte ausgebracht und mit den m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak-haltigen Reagenzien versetzt. Der steril filtrierte Hybridomaüberstand wurde in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:4, 1:8, 1:16, 1:32), das aufgereinigte Eluat und der Aszites in den Konzentrationen 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80 eingesetzt. Alle Verdünnungen wurden in PBS vorgenommen. Als Kontrolle dienten Wells, denen anstelle des Antikörpers 100  $\mu$ l an PBS zugegeben wurde (PBS-Kontrolle). Die eingesetzte Menge an mTNF betrug 0,75 ng/Well. Zur Totkontrolle wurde einigen Wells 2 % Triton X-100 zugegeben, welches die Zellmembran zerstört und so die Zellen abtötet. Die Bestimmung der Proliferationsrate erfolgte nach 48 h durch die Zugabe einer MTT-Stammlösung (10  $\mu$ l pro Well). Die Reaktion wurde nach 4 h in jedem Well mit 70  $\mu$ l einer SDS-Lösung abgestoppt und die Absorption im ELISA-Reader bei 540 nm gemessen. Zusätzlich wurde die Zellvitalität anhand zellmorphologischer Kriterien im Lichtmikroskop beurteilt.

In einem weiteren Schritt wurde der m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak hinsichtlich möglicher aktivierender Eigenschaften auf den mTNFR2 untersucht (Abb. 13). Dazu wurde das Zellwachstums nach Zugabe der m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak haltigen Reagenzien (Hybridomaüberstand, Eluat, Aszites) in Abwesenheit von mTNF beurteilt. Im Falle aktivierender Eigenschaften des Antikörpers auf seinen Zielrezeptor, wäre die Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrollpopulation (kein TNF, kein Antikörper) auch in Abwesenheit des Zytokins gesteigert. Die Reagenzien wurden in den verschiedenen Verdünnungsstufen direkt auf die ausgesäten CT-6 Zellen gegeben und die Proliferationsrate nach 48 h nach selbigem Verfahren ermittelt.



**Abbildung 13: Schematische Darstellung des Bioassays zur Testung aktivierender Eigenschaften des m- $\alpha$ -mTNFR2 auf den zellständigen mTNFR2.**

Im Falle aktivierender Eigenschaften des m- $\alpha$  mTNFR2-Ak auf den mTNFR2 würde die Proliferationsrate der CT-6-Zellen auch in Abwesenheit von TNF stimuliert.

## 2.2.6 Durchflusszytometrie

### 2.2.6.1 Allgemeines Prinzip der FACS-Analyse

Die Durchflusszytometrie dient dazu, Einzelzellen einer Suspension durch ihre spezifischen Lichtstreuungseigenschaften, sowie der emittierten Fluoreszenzstrahlung näher zu

charakterisieren. Dies geschieht, indem einerseits durch eine Messung der Vorwärtslichtstreuung (FSC, *Forward Scatter*) die Zellform und die relative Zellgröße bestimmt werden und andererseits mit der Seitwärtslichtstreuung (SSC, *Side Scatter*) die Granularität der Zellen ermittelt wird. Durch die immunologische Färbung mit spezifischen Antikörpern können die Zellen anhand ihrer auf der Zelloberfläche exprimierten, zelltypischen Antigene identifiziert werden. Es handelt sich dabei um fluoreszenzmarkierte Antikörper, die ein charakteristisches Emissionsspektrum aufzeigen und so eine Sortierung der unterschiedlichen Zellpopulationen anhand der identifizierten Merkmale ermöglichen. Alle in dieser Arbeit vorgenommenen durchflusszytometrischen Messungen erfolgten mit dem FACScan Flow Cytometer (Becton Dickinson).

#### **2.2.6.2 Untersuchung der Antikörperbindung an den mTNFR2 transfizierter CHO-Zellen**

Um zu überprüfen, ob der m- $\alpha$ -m-TNFR2-Ak an den zellständigen mTNFR2 bindet, wurde eine transgene CHO-Zelllinie (CHO tg) verwendet, die den mTNFR2 auf ihrer Zelloberfläche exprimiert. Als Kontrolle dienten CHO-Wildtypzellen (CHO wt), die den mTNFR2-Rezeptor nicht besitzen.

Zur durchflusszytometrischen Untersuchung wurden die Zellen mit  $1 \times 10^6$  Zellen auf die FACS Röhren verteilt, bei 300 g für 5 min in der Zentrifuge pelletiert und der Überstand verworfen. Der Hybridomaüberstand wurde direkt auf die Zellen gegeben und die FACS-Röhren für 1 h auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation der Zellen wurde der Überstand verworfen und ein Waschschriff in 4 ml FACS-Puffer (10 % [v/v] FCS in PBS) angeschlossen. Dazu wurden die Zellen in dem zugegebenen FACS-Puffer resuspendiert und in der Zentrifuge erneut pelletiert (300 g, 10 min). Nun erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ l eines FITC-markierten Sekundärantikörpers ( $\alpha$ -Maus-IgG-FITC) der Konzentration 1:100 in FACS-Puffer. Nach einer Inkubationszeit von 30 min im Dunkeln wurden überschüssige Antikörper in einem weiteren Waschschriff entfernt. Nach der Aufnahme der Zellen in 300  $\mu$ l FACS-Puffer wurden die Zellen im Durchflusszytometer vermessen. Um den Anteil der mTNFR2-transformierten Zellen in der CHO tg Population zu ermitteln, wurden Zellen mit einem gegen das mTNFR2-Epitop gerichteten käuflichen  $\alpha$ -Maus-CD120b-AF647-Antikörper (Konzentration 1:20) gefärbt und nach oben beschriebenen Verfahren durchflusszytometrisch analysiert.

### 2.2.6.3 Untersuchung der Antikörperbindung an den mTNFR2 der Milzzellen

Im Weiteren sollte die Bindungsfähigkeit des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak an den vitalen mTNFR2 peripherer T-Zellen der Milz durchflusszytometrisch untersucht werden. Als Kontrolle dienten die Milzzellen von mTNFR2<sup>-/-</sup> Mäusen. Um die Expression des mTNFR2 auf den T-Zellen der Milz zu erhöhen, wurden die gewonnenen Zellen mittels der gegen die T-Zellrezeptoren gerichteten  $\alpha$ -CD3- und  $\alpha$ -CD28-Antikörper gemäß Kap.2.2.1.7 über 48 h stimuliert. Im Anschluss daran erfolgte die Verteilung der Zellen mit  $1 \times 10^6$  Zellen pro FACS-Röhrchen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen auf den Zellen wurde ein 30 minütiger Blockierungsschritt mit 100  $\mu$ l eines gegen die Fc $\gamma$ -Rezeptoren II und III gerichteten Antikörpers (10  $\mu$ g/ml in FACS-Puffer) vorgenommen. Nach einem Waschschrift mit 4 ml FACS-Puffer wurden die Zellen erneut pelletiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss daran wurden 100  $\mu$ l des Hybridomaüberstands, des Eluats (Verdünnung 1:2 in FACS-Puffer) bzw. des Aszites (Verdünnungen 1:2, 1:10 in FACS-Puffer) zu den Zellen gegeben und diese darin resuspendiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen in einem FACS-Röhrchen mit 100  $\mu$ l Serum einer titerpositiven Maus (Verdünnung 1:20 in FACS-Puffer) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h und einem weiteren Waschschrift in FACS-Puffer wurde der FITC-markierte Sekundärantikörper  $\alpha$ -Maus-IgG (1:100 in FACS-Puffer) zugegeben. In einem weiteren Blockierungsschritt (30 min, 4 °C) wurden dann die Bindungsstellen des Sekundärantikörpers mit Mausserum (Verdünnung 1:10) abgesättigt. Die Oberflächenfärbung der verschiedenen T-Zell-Subpopulationen wurde mit fluoreszenzmarkierten  $\alpha$ -CD4 und  $\alpha$ -CD8-Antikörpern vorgenommen. Nach einer Inkubation für weitere 30 min auf Eis in Dunkelheit wurden die Zellen durch einen weiteren Waschschrift von nicht gebundenen Antikörpern befreit und anschließend in der Zentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zur durchflusszytometrischen Vermessung in 300  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen. Alle verwendeten Antikörper wurden in FACS-Puffer verdünnt und in den in Tabelle 13 angegebenen Konzentrationen eingesetzt.

**Tabelle 13:** Tabelle der in der Durchflusszytometrie eingesetzten Antikörper

Antikörper	Verdünnung
$\alpha$ -Maus Fc $\gamma$ RII / III (Klon 2.4G2; 1,84mg/ml)	1:150
$\alpha$ -Maus IgG-FITC	1:100
$\alpha$ -Maus CD4-APC	1:200
$\alpha$ -Maus CD8a-Per-CP	1:200

---

#### **2.2.6.4 Untersuchung der Antikörperbindung an den mTNFR2 der Thymozyten**

Um unspezifische Bindungen des FITC-markierten Sekundärantikörpers an die T-Zellen zu verringern und eine höhere T-Zellpopulation zu gewinnen, wurden die Thymozyten nach dem in Kap.2.2.1.6 beschriebenen Verfahren gewonnen. Die Färbung der Zellen für die Durchflusszytometrie erfolgte nach dem in Kap. 2.2.6.3 erläuterten Schema.



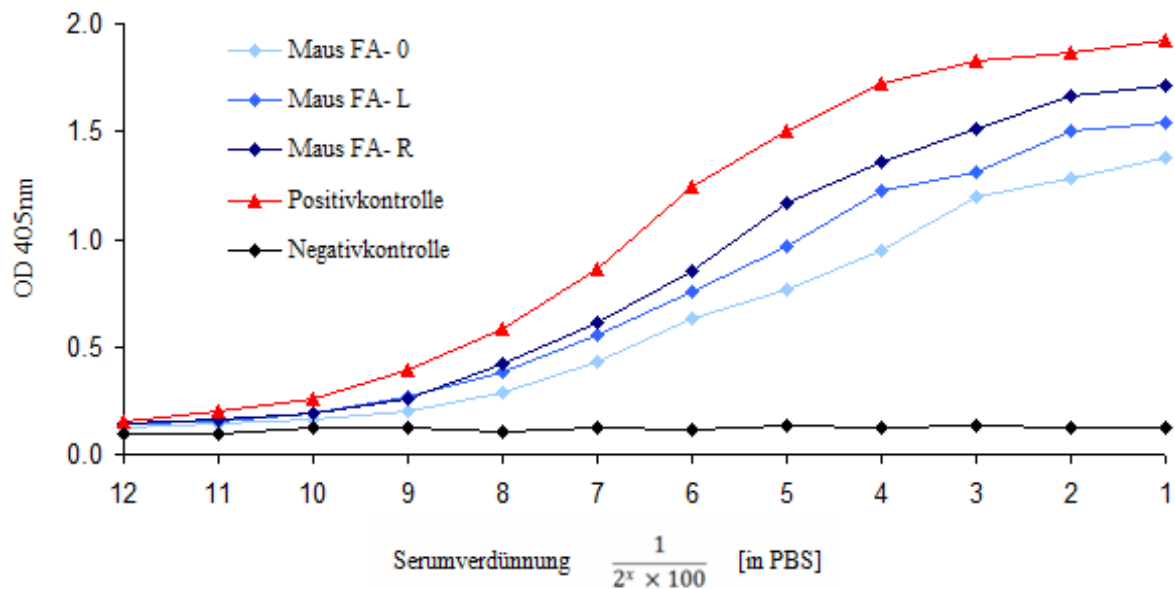
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Herstellung monoklonaler Antikörper

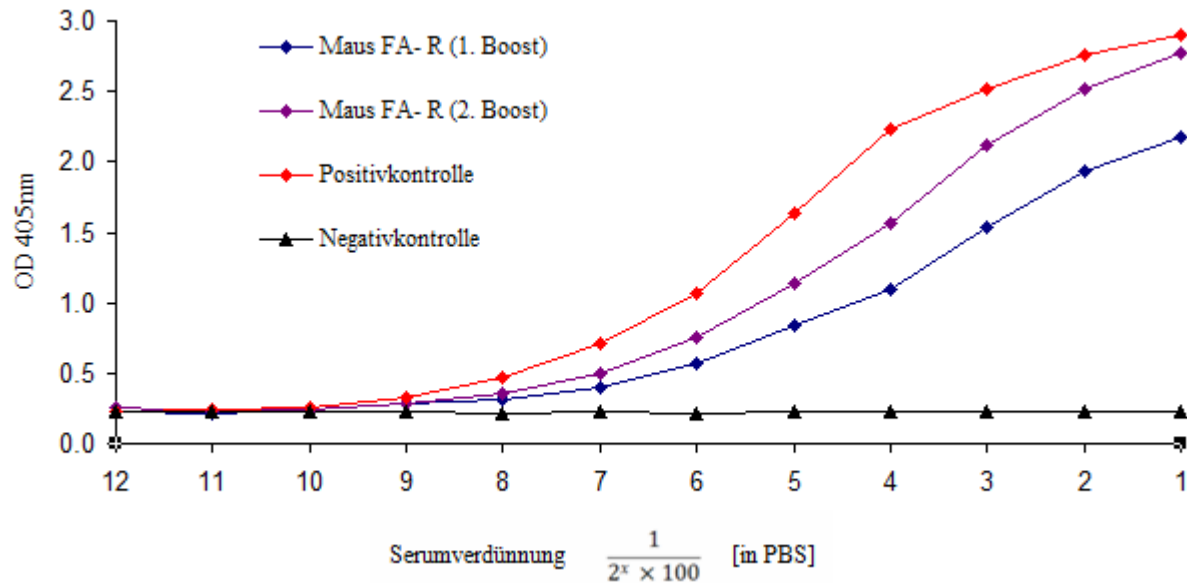
##### 3.1.1 Immunisierung von mTNFR2<sup>-/-</sup> Mäusen

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper wurden drei acht Wochen alte weibliche mTNFR2-defiziente Mäuse (FA-0, FA-L, FA-R) nach dem in Kap. 2.2.2.2 beschriebenen Verfahren immunisiert. Der erste Titertest fand drei Tage nach dem ersten Boost statt und zeigte in den polyklonalen Seren aller drei Mäuse eine Antikörperproduktion (Abb. 14A). Der höchste Immunglobulin-Titer war dabei in dem Serum der für die spätere Zellfusion ausgewählten FA-R Maus nachzuweisen. Der zweite Titertest erfolgte mit dem Serum der zur Fusion verwendeten FA-R Maus. Dieses wurde drei Tage nach dem zweiten Boost durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus gewonnen. Dabei zeigte sich ein durch den zweiten Boost deutlich gesteigerter Antikörpertiter im Serum (Abb. 14B).

A



B



**Abbildung 14:** Nachweis der m- $\alpha$ -mTNFR2-Antikörper im Serum der immunisierten Mäuse nach dem ersten Boost (A). Im Serum der für die Zellfusion verwendeten FA-R Maus wurde durch den zweiten Boost ein deutlich höherer Antikörpertiter erreicht (B).

Die Immunisierung der mTNFR2<sup>-/-</sup> Mäuse, sowie die erste und zweite Boosterinjektion erfolgte mit je 100  $\mu$ g des rekombinant hergestellten mTNFR2-V5-HIS-Antigens. Zur Bestimmung des Immunglobulintiters der Mausseren wurden ELISA-Mikrotiterplatten verwendet, die mit 200 ng/Well des mTNFR2-IgG-Protein beschichtet wurden. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte durch einen mit einer Alkalischen Phosphatase gekoppelten  $\alpha$ -mouse-IgG ( $\gamma$ -chain specific)-Antikörper. Als Positivkontrolle wurde das Serum einer in eine frühere Fusion eingegangenen titerpositiven Maus verwendet. Zur Negativkontrolle diente das Serum einer nicht immunisierten mTNFR2<sup>-/-</sup> Maus. Dargestellt ist der aus Duplikaten errechnete Mittelwert der im ELISA-Reader bestimmten Optischen Dichte bei 405 nm.

### 3.1.2 Zellfusion

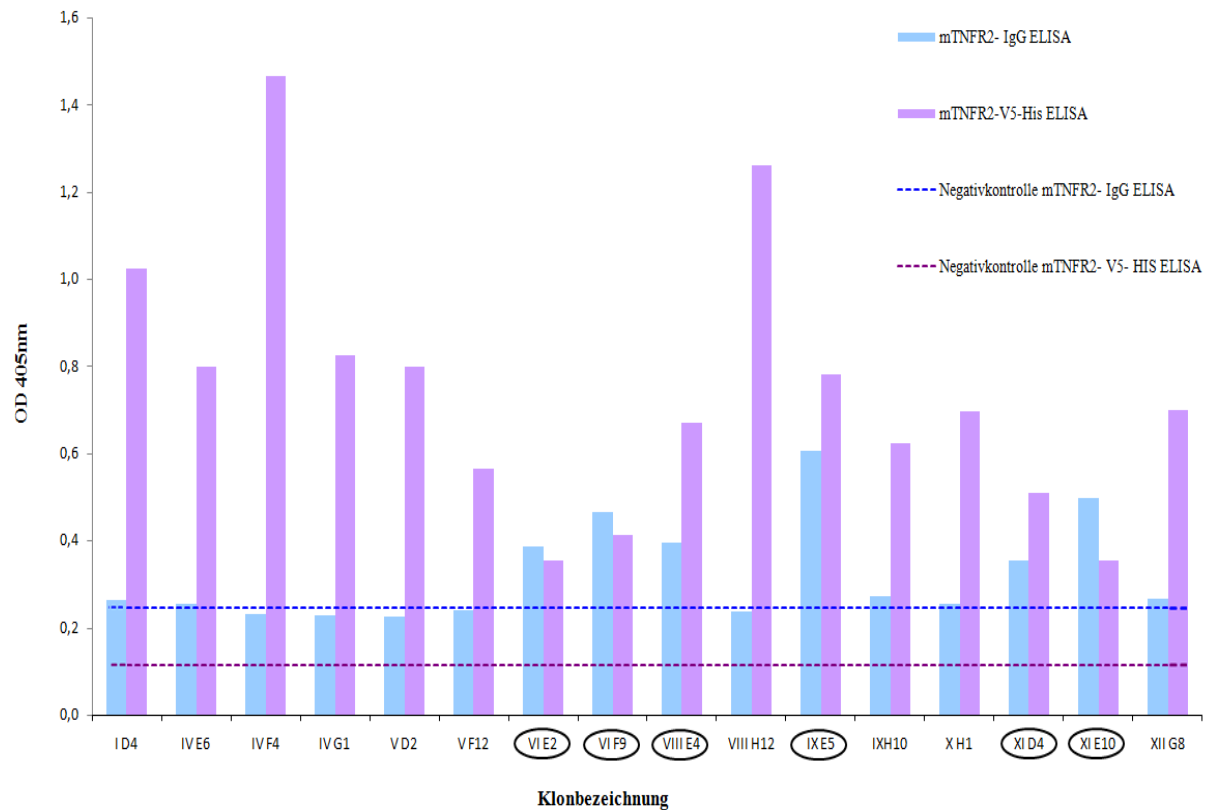
Für die Zellfusion wurde die Milz der titerstärksten FA-R Maus eingesetzt. Da etwa ein Drittel der Milz nekrotisch war, wurde dieser Anteil verworfen und nicht für die Zellfusion verwendet. Die Aufbereitung der Milzzellen erfolgte nach der in Kap.2.2.1.5 beschriebenen Vorgehensweise. Die Fusion erfolgte mit  $3,6 \times 10^7$  Milzzellen und  $1,2 \times 10^7$  Myelomazellen (Verhältnis 1:3) nach der in Kap.2.2.2.7 erläuterten Methode. Von den 15 angelegten 96-Well Mikrotiterplatten zeigte sich nach sieben Tagen in 1201 der insgesamt 1440 Wells (83,4 %)

lichtmikroskopisch ein Zellwachstum, wobei ein Großteil der Wells mehrere Zellkolonien enthielt.

### **3.1.3 Antikörperproduktion und Testung im ELISA**

Der erste Test der Hybridomaüberstände auf eine spezifische Antikörperproduktion fand 10 Tage nach der Fusion statt. Dazu wurden die mit dem mTNFR2-IgG-Protein beschichteten ELISA-Platten verwendet, die nach dem in Kap.2.2.3.2 beschriebenen Verfahren hergestellt wurden. Im ersten Titertest zeigten 31 der 1201 getesteten Wells (2,6 %) ein positives Testergebnis. Im zweiten Titertest, der 14 Tage nach der Fusion stattfand, war nur noch in 25 der kolonisierten Wells eine Antikörperproduktion nachweisbar (2,1 %). Um Kreuzreaktivitäten der Antikörper mit einem Epitop des zur Immunisierung verwendeten mTNFR2-V5-His-Antigens auszuschließen, wurde die dritte Testung der Hybridomaüberstände sowohl auf einer mit dem mTNFR2-IgG-Protein, als auch auf einer mit dem TNFR2-V5-His-Protein beschichteten ELISA-Platte durchgeführt.

Wie in Abbildung 15 dargestellt, zeigten dabei 16 der getesteten Hybridomaüberstände eine Bindung an das mTNFR2-V5-His-Protein, wovon jedoch 10 nicht an das mTNFR2-IgG-Protein banden (z.B. IV F4, IV G1, V D2, V F12). Da diese Antikörper vermutlich gegen eine Komponente des Immunisierungsproteins und nicht spezifisch mit dem mTNFR2-Epitop reagierten, wurden sie nicht weiter kultiviert.



**Abbildung 15: Testung der Hybridomaüberstände auf eine Antikörperbindung an das mTNFR2-V5-His-Protein bzw. das mTNFR2-IgG-Protein im ELISA.**

Zur Testung der Hybridomaüberstände dienten ELISA-Platten, die mit dem zur Immunisierung verwendeten mTNFR2-V5-HIS Protein bzw. dem mTNFR2-IgG-Protein beschichtet wurden. Als Negativkontrolle wurde der Überstand einer sicher als negativ geltenden Hybridomazelllinie verwendet. Gebundene Antikörper wurden mit dem  $\alpha$ -mouse-IgG-AP („ $\gamma$ -chain specific“) detektiert. Dargestellt sind die gemessenen Optischen Dichten der getesteten Zellklone, sowie die Grenzwerte der jeweiligen Negativkontrolle. Die sechs markierten Klone zeigten eine spezifische Bindung gegenüber beiden Rezeptorproteinen und wurden weiter kultiviert.

Diejenigen sechs Klone, die gegenüber beiden festphasengebundenen Proteine eine positive Reaktion zeigten, wurden als spezifisch für das mTNFR2-Epitop gewertet und weiter kultiviert. Dabei handelte es sich um die Klone der Mutterwells VI E2, VI F9, VIII E4, IX E5, XI D4 und XI E10.

Einen Überblick über den prozentualen Anteil und die genaue Anzahl der im Titertest 1-3 positiven Klone gibt Tabelle 14.

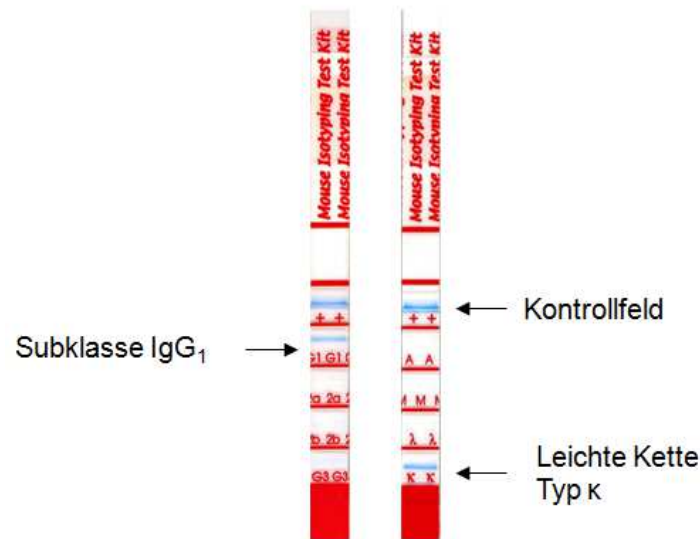
**Tabelle 14: Übersicht über den prozentualen Anteil und die Absolutzahlen der im mTNFR2-IgG-ELISA als positiv gewerteten Zellklone.**

	Positive Klone im 1. Titertest	Positive Klone im 2. Titertest	Positive Klone im 3. Titertest
Prozentsatz der Gesamtklonzahl (1201)	2,6	2,1	0,5
Anzahl positiver Klone	31	25	6

Um zu verhindern, dass die in den positiven, polyklonalen Wells heranwachsenden Hybridoma von anderen Kolonien überwuchert werden, wurden diese in regelmäßigen Abständen auf Tochterplatten gesplittet und weiter subkloniert. Von den sechs in Kultur behaltene Hybridomazelllinien stellten einige nach wenigen Wochen ihre Antikörperproduktion ein, sodass nur der Klon IX E5 dauerhaft in Kultur genommen werden konnte. Bei den Versuchen, den Zellklon in ein PEC-freies Milieu zu überführen, zeigten die ausgesäten Zellen lichtmikroskopisch bereits nach wenigen Tagen eine apoptotische Zellmorphologie, sodass der Klon weiterhin in Anwesenheit der Peritonealmakrophagen kultiviert werden musste. Nach mehrmaliger Subklonierung mittels des in Kap. 2.2.2.8 beschriebenen Verfahrens konnte ein stabil wachsender und kontinuierlich monoklonale Antikörper produzierender Zellklon etabliert werden, der die Bezeichnung DJ2008 erhielt.

#### 3.1.4 Bestimmung der Immunglobulin-Subklasse

Die Bestimmung der Antikörper-Subklasse erfolgte mittels des *mouse monoclonal antibody isotyping Test Kit* der Firma Serotec. Wie in Abbildung 16 gezeigt, handelte es sich im Falle des monoklonalen Antikörpers DJ2008 um ein  $\gamma$ -Immunglobulin der Subklasse  $G_1\kappa$ , das die schweren Ketten vom Subtyp  $G_1$ , und die leichten Ketten vom Typ  $\kappa$  besaß.



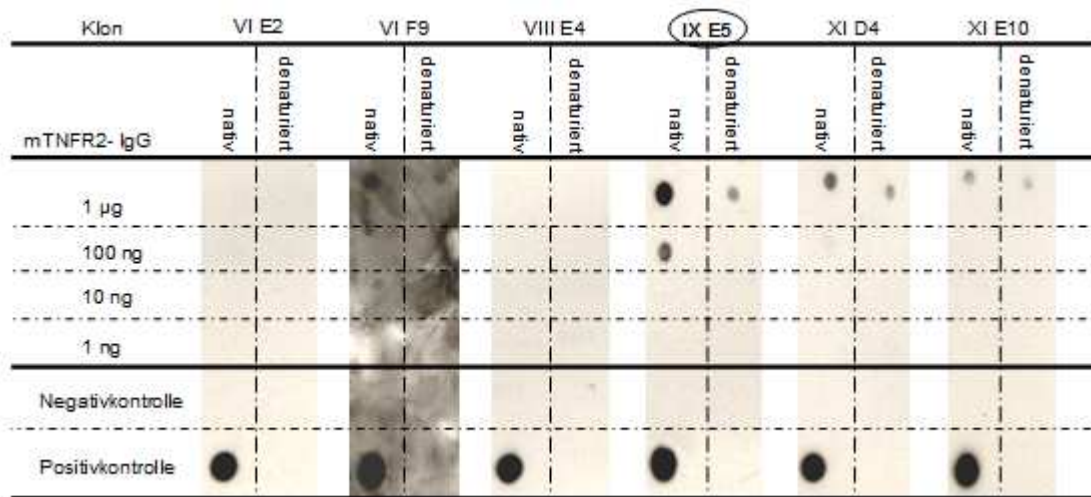
**Abbildung 16: Isotypbestimmung des monoklonalen Antikörpers DJ2008.**

Mit dem *mouse monoclonal antibody isotyping Test Kit* (Serotec) konnte der monoklonale m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak DJ2008 als Isotyp IgG<sub>1</sub>- $\kappa$  bestimmt werden.

### 3.2 Charakterisierung des m- $\alpha$ -mTNFR2-Antikörpers

#### 3.2.1 Spezifitätsnachweis im Dot Blot

Die von den Hybridomazellen produzierten Antikörper wurden auf ihre Fähigkeit zur Detektion des rekombinanten mTNFR2-IgG im Dot Blot-Verfahren getestet. Der Nachweis gebundener Antikörper an das immobilisierte Protein erfolgte mit dem Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper  $\alpha$ -mouse-IgG (*whole molecule*) durch das in Kap. 2.2.4.1 beschriebene Verfahren. Abbildung 17 zeigt die Bindung an das mTNFR2-IgG-Protein durch die Hybridomaüberstände der Klone IX E5, XI D4 und XI E10. Dabei sind jedoch unterschiedliche Affinitäten der jeweiligen Antikörper für das Protein erkennbar. Während die Klone XI E10 und XI D4 nur die maximal aufgetragene native Proteinmenge von 1  $\mu$ g detektierten, band der Klon IX E5 bereits an eine zehnfach geringere Rezeptormenge von 100 ng. Die Bindung an die native Form des Proteins im Vergleich zur denaturierten Form war bei allen drei Klonen stärker. In der Negativkontrolle zeigte keiner der Antikörper eine Reaktion mit BSA, was die Spezifität der Antikörper für das Rezeptorprotein unterstreicht. Der Klon VI F9 zeigte eine unspezifische Bindungsreaktion, was zur vollständigen Schwärzung der Membran auf dem Röntgenfilm führte. Die Testüberständen der Klone VI E2 und VIII E4 erkannten das mTNFR2-IgG im Dot Blot-Verfahren nicht.



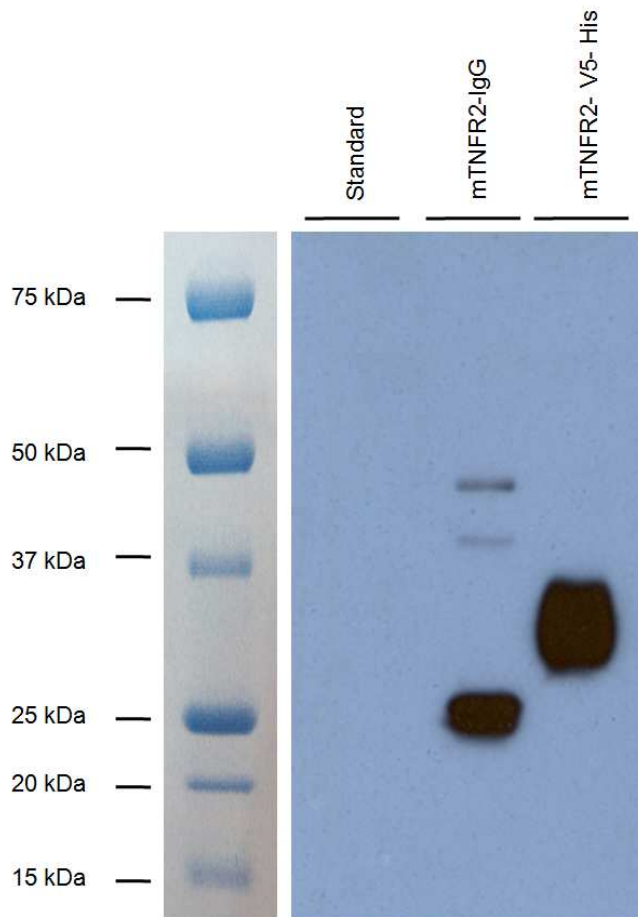
**Abbildung 17: Detektion von mTNFR2-IgG durch Antikörper-enthaltende Hybridomaüberstände im Dot Blot.**

Das Protein mTNFR2-IgG wurde mit den angegebenen Mengen auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Durch einen Blockierungsschritt in Milchpulverlösung wurden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Nach Inkubation der Membranen mit den jeweiligen Hybridomaüberständen erfolgte der Nachweis gebundener Antikörper durch den POX-gekoppelten  $\alpha$ -mouse-IgG-Antikörper und der Entwicklung auf Röntgenfilmen. Als Negativkontrolle diente BSA, für die Positivkontrolle wurde pro Membran 1  $\mu$ l eines Serums einer titerpositiven Maus aufgetragen.

### 3.2.2 Spezifitätsnachweis im Western Blot

Zur weiteren Charakterisierung des Klon DJ2008 wurde das Bindungsverhalten an die beiden Rezeptorproteine mTNFR2-IgG und mTNFR2-V5-His im Western Blot überprüft.

Abbildung 18 zeigt die spezifische Bindung des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak an die beiden im SDS-Gel aufgetrennten und auf eine PVDF-Membran transferierten Proteine.



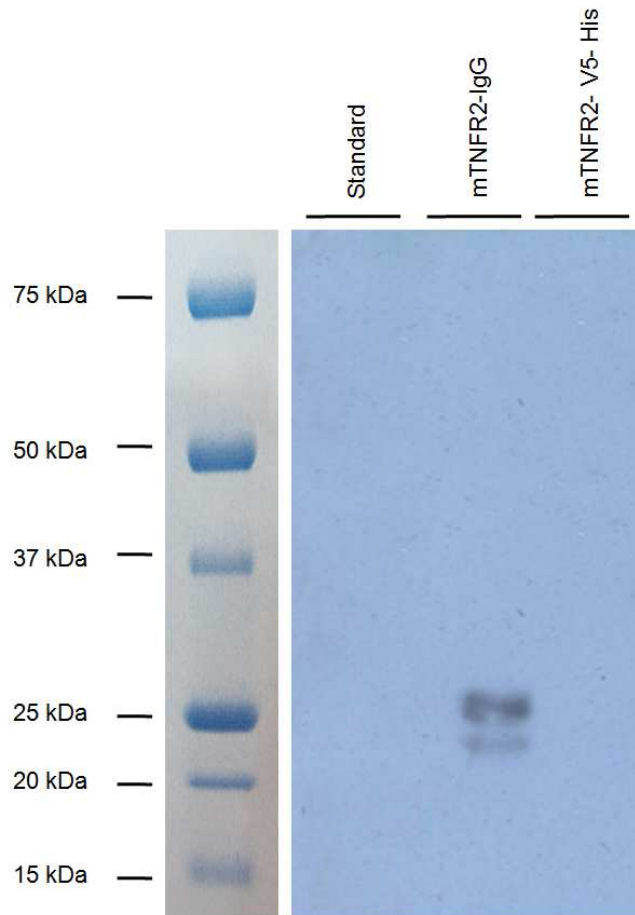
**Abbildung 18: Detektion der mTNFR2-Proteine durch den m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak im Western Blot-Verfahren.**

Die beiden Proteine mTNFR2-IgG und mTNFR2-V5-His wurden mit 1,5  $\mu$ g pro Tasche im SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Nach einem Blockierschritt in 10 % (w/v) Milchpulverlösung erfolgte die Inkubation mit dem Hybridomaüberstand des Klon DJ2008. Als Detektions-Antikörper wurde der  $\alpha$ -mouse-IgG (*whole molecule*)-POX (1:5000 in 0,5 % [w/v] Milchpulverlösung) eingesetzt.

In der Spur des aufgetragenen mTNFR2-IgG zeigten sich mehrere Banden unterschiedlicher molekularer Größe, die auf eine Fragmentierung des Proteins schließen ließen. Die stärkste Bandenfärbung zeigte sich dabei im Molekulargewichtsbereich von ~25-28 kDa. In diesem Molekulargewichtsbereich liegen sowohl das humane Fc-Fragment, als auch die extrazelluläre mTNFR2-Domäne des im SDS-Gel aufgetrennten mTNFR2-IgG Proteins. Zusätzlich wurden zwei weitere Fragmente im Bereich von ~40 kDa und ~47 kDa detektiert. Das mittels SDS-Page aufgetrennten mTNFR2-V5-HIS Protein zeigte eine Bande bei ~30 kDa, was der molekularen Größe des rekombinanten mTNFR2-V5-His Proteins entspricht (Abb.6). Zur Kontrolle erfolgte der Nachweis der humanen Fc-Domäne des mTNFR2-IgG mit dem HRP-gekoppelten donkey- $\alpha$ -Human-IgG-Antikörper (Abb. 19). Auch



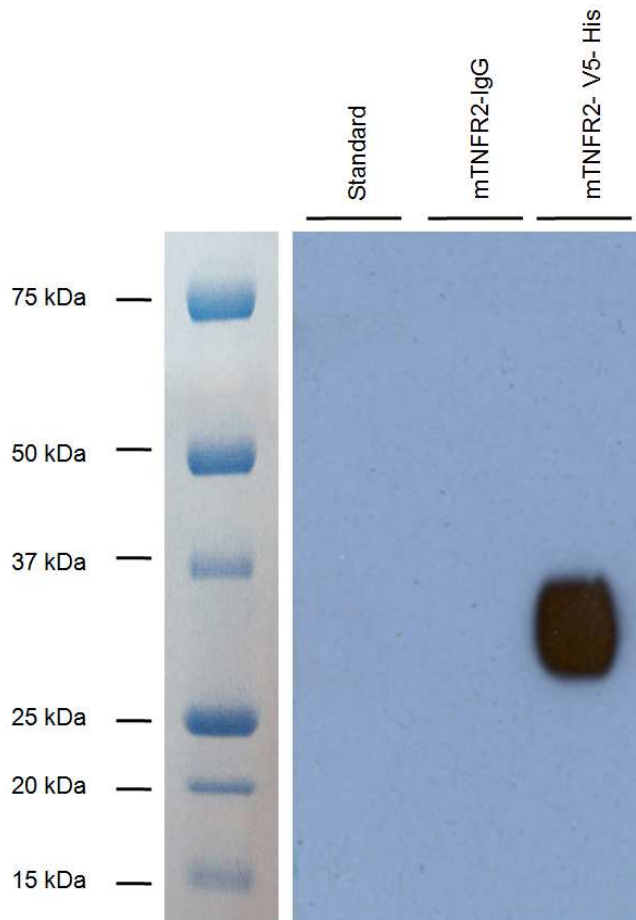
hier zeigte sich die Fragmentierung des Proteins durch die Detektion verschiedener Spaltprodukte mit Molekulargewichten im Bereich von ~23 kDa und ~25 kDa.



**Abbildung 19: Nachweis des rekombinanten mTNFR2-IgG-Protein im Western Blot-Verfahren.**

Pro Spur wurden 1,5 µg des mTNFR2-IgG und mTNFR2-V5-His Protein im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mit dem HRP-gekoppelten donkey- $\alpha$ -human-IgG-Antikörper (1:5000 in 0,5 % [w/v] Milchpulverlösung).

Zur Detektion des mTNFR2-V5-His-Proteins wurde der gegen das His-tag gerichtete  $\alpha$ -penta-His-Antikörper eingesetzt. Mit Hilfe des POX-gekoppelten Sekundärantikörpers  $\alpha$ -mouse-IgG (*whole molecule*) erfolgte die Bandenfärbung bei einem Molekulargewicht von ~30 kDa (Abb.20).



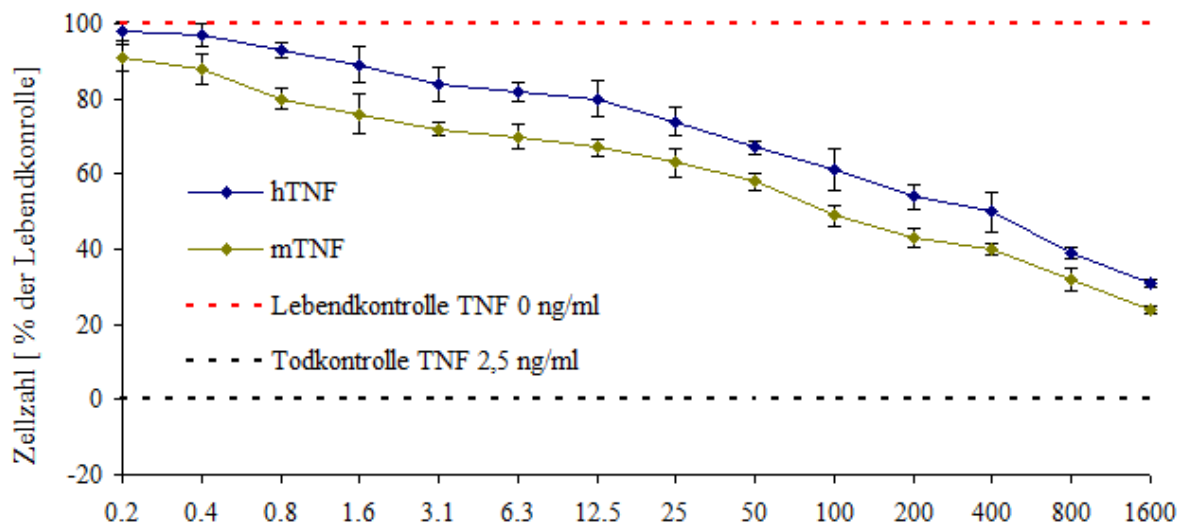
**Abbildung 20:** Nachweis des rekombinanten mTNFR2-V5-His-Protein im Western Blot.-Verfahren.

Pro Spur wurden 1,5 µg des mTNFR2-IgG und mTNFR2-V5-His Protein im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Als Primärantikörper diente der  $\alpha$ -penta-His-Antikörper. Gebundene Antikörper wurden mit dem POX-gekoppelten  $\alpha$ -mouse-IgG (*whole molecule*) (1:5000 in 0,5 % [w/v] Milchpulverlösung) nachgewiesen.

### 3.2.3 Kreuzreaktivitätstestung im TNF-induzierten Zytotoxizitätstest

In einem Vorversuch wurde eine für die Durchführung aller weiteren Versuchsansätze geeignete Konzentration an TNF ermittelt, die durch die Aktivierung des membranständigen mTNFR1 zu einer Letalitätsrate von etwa 50 % der L-929 Zellpopulation führte. Die notwendige TNF Menge lag im Falle des mTNF bei ~100 pg/ml, bei Verwendung von hTNF bei ~400 pg/ml (Abb. 21). Die TNF-induzierte Sterblichkeitsrate der Zellpopulationen war dabei stets streng konzentrationsabhängig. Mit der Menge des zugegebenen TNF erhöhte sich auch der Anteil apoptotischer Zellen. In allen zugegebenen TNF-Konzentrationen lag die mTNF-induzierte Zellsterblichkeit deutlich über der hTNF-induzierten Apoptoserate. Mit der Zugabe von 0,8 pg/ml des mTNF ergab sich ein zytotoxischer Effekt bei ~20 % der Zellen. Bei der identischen Menge an hTNF lag dieser Wert wesentlich niedriger bei einer

Letalitätsrate von ~10 %. Um eine Sterblichkeitsrate von 20 % auch durch das hTNF zu induzieren, musste eine deutlich höhere Zytokinmenge von 12,5 pg/ml zugegeben werden.



**Abbildung 21:** Über den mTNFR1-vermittelte Apoptoserate der L-929-Zellen in Anwesenheit von hTNF und mTNF.

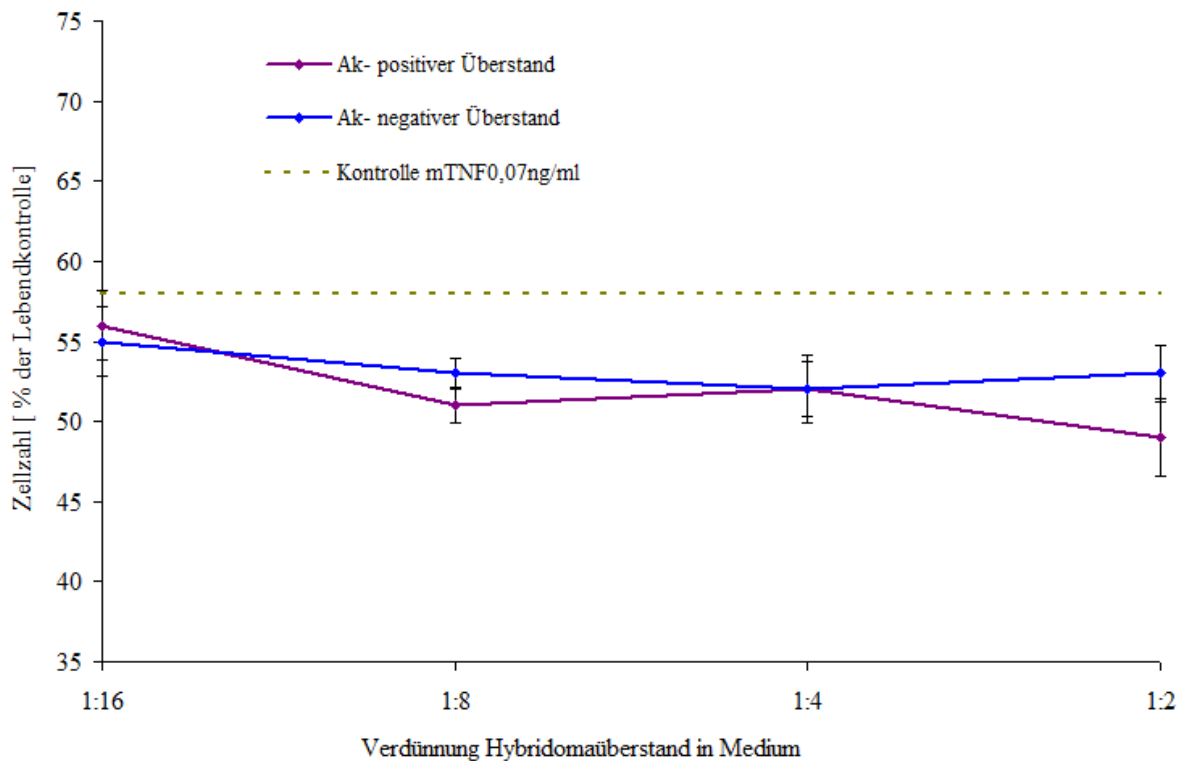
Die Zellen wurden in Aktinomycin-D-haltigem Medium (2 µg/ml) für 24 h mit der angegebenen Menge an TNF inkubiert. Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte nach MTT-Zugabe mittels Messung der OD bei 540 nm im Photometer. Den Zellen der Lebendkontrolle wurde keine TNF zugegeben, die Todkontrolle wurde mit einer absolut toxischen TNF-Menge von 2,5 ng/ml versetzt. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus Triplikaten.

Auch in der morphologischen Beurteilung der Zellen unter dem Lichtmikroskop zeigte sich eine stärkere Zytotoxizität des zugegebenen mTNF im Vergleich zum hTNF. Beim Vergleich identischer TNF-Mengen war der Anteil apoptotischer Zellen in den mit mTNF-inkubierten Wells deutlich höher als in den mit hTNF-inkubierten Wells. Die apoptotischen Zellen unterschieden sich von den vitalen Zellen durch eine raue Oberflächenstruktur, das verringerte Zellvolumen und die erhöhte Granulierung des Zellplasmas. In den TNF-freien Wells (Lebendkontrolle) war ein dichter Rasen an intakten, fibroblastischen Zellen zu sehen, die Todkontrolle beinhaltete keine vitalen Zellen.

Davon ausgehend wurden in einem weiteren Versuchsansatz mögliche protektive oder apoptosesteigernde Effekte des m-α-mTNFR2-AK auf die L-929-Zellpopulation untersucht. Wie in Abbildung 22 ersichtlich, hatte der m-α-mTNFR2-AK keinen Einfluss auf die Zellsterblichkeitsrate der mTNF-inkubierten Zellen. Auch der unterschiedliche Gehalt an konditioniertem Medium, der in den jeweiligen Verdünnungsstufen des Hybridomaüberstands

enthalten war, hatte keinen Einfluss auf die Zellapoptose. Der Prozentsatz stoffwechselaktiver Zellen lag sowohl bei Zugabe des Antikörper-positiven Hybridomaüberstands als auch des negativ getesteten Hybridomaüberstands im Bereich von ~50 %. Dies entsprach auch der ermittelten Zellviabilität der Kontrollpopulation in Abwesenheit eines Überstands.

Damit zeigten sich keinerlei kreuzreaktive Eigenschaften des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak gegenüber dem membranständigen mTNFR1-Rezeptor der L-929-Zellen.



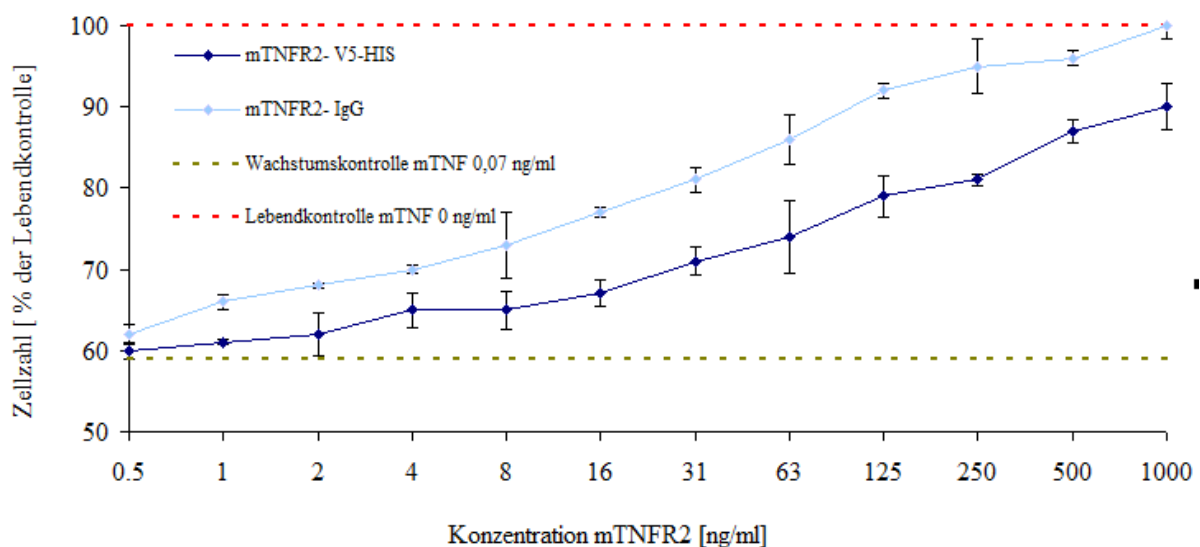
**Abbildung 22: Kreuzreaktivitätstest des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak mit dem mTNFR1.**

Die L-929-Zellen wurden mit dem Antikörper-positiven bzw. Antikörper-negativen Hybridomaüberstand in den angegebenen Verdünnungsstufen für 2 h inkubiert. Die Zugabe von mTNF in der Konzentration 0,07 ng/ml erfolgte in Actionomycin-D-haltigem Medium (2  $\mu$ g/ml). Als Kontrolle dienten Wells ohne Überstand. Die Lebendkontrolle enthielt kein mTNF, die Todkontrolle wurde einer absolut toxischen Menge von 2,5 ng/ml mTNF ausgesetzt. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus Triplikaten.

### 3.2.4 Testung hemmender Eigenschaften im TNF-induzierten Zytotoxizitätstest

In dem durchgeführten Versuchsansatz wurde zunächst die Auswirkung einer TNFR2-Zugabe auf die TNF-induzierte Sterblichkeit im Zytotoxizitätsassay untersucht. Hierbei zeigte sich sowohl für das mTNFR2-IgG, als auch für das mTNFR2-V5-His eine schützende Wirkung der Zellen vor dem TNF-induzierten Zelltod (Abb.23). Die Wachstumskontrolle (0,07ng/ml

mTNF, kein mTNFR2-Rezeptor) lag in Anwesenheit von 0,07 ng/ml mTNF bei einer Zellviabilität von ~60 %. Beide löslichen Rezeptorproteine konnten die Sterblichkeitsrate durch eine Neutralisation des TNF-Zytokins beeinflussen. Dieser Effekt erhöhte sich mit der Menge an zugegebenem Rezeptor. Ein vollständiger Schutz der Zellen wurde bei einer mTNFR2-IgG-Konzentration von 1000 ng/ml erreicht, wobei der mit der gleichen Konzentration an mTNFR2-V5-His erzielte Zellschutz nur bei ~90 % lag. Diejenige Rezeptorkonzentration, die zu einer gesteigerten Überlebensrate von ~20 % führte (80 % Wert) lag im Falle des zugegebenen mTNFR2-IgG bei ~31 ng/ml, während demgegenüber 250 ng/ml des mTNFR2-V5-His notwendig waren. Diese bessere Neutralisationsfähigkeit des mTNFR2-IgG im Vergleich zum mTNFR2-V5-His zeigte sich in allen eingesetzten Rezeptorkonzentrationen. In allen weiteren Versuchen wurde daher zur Neutralisation des mTNF das mTNFR2-IgG-Protein eingesetzt.

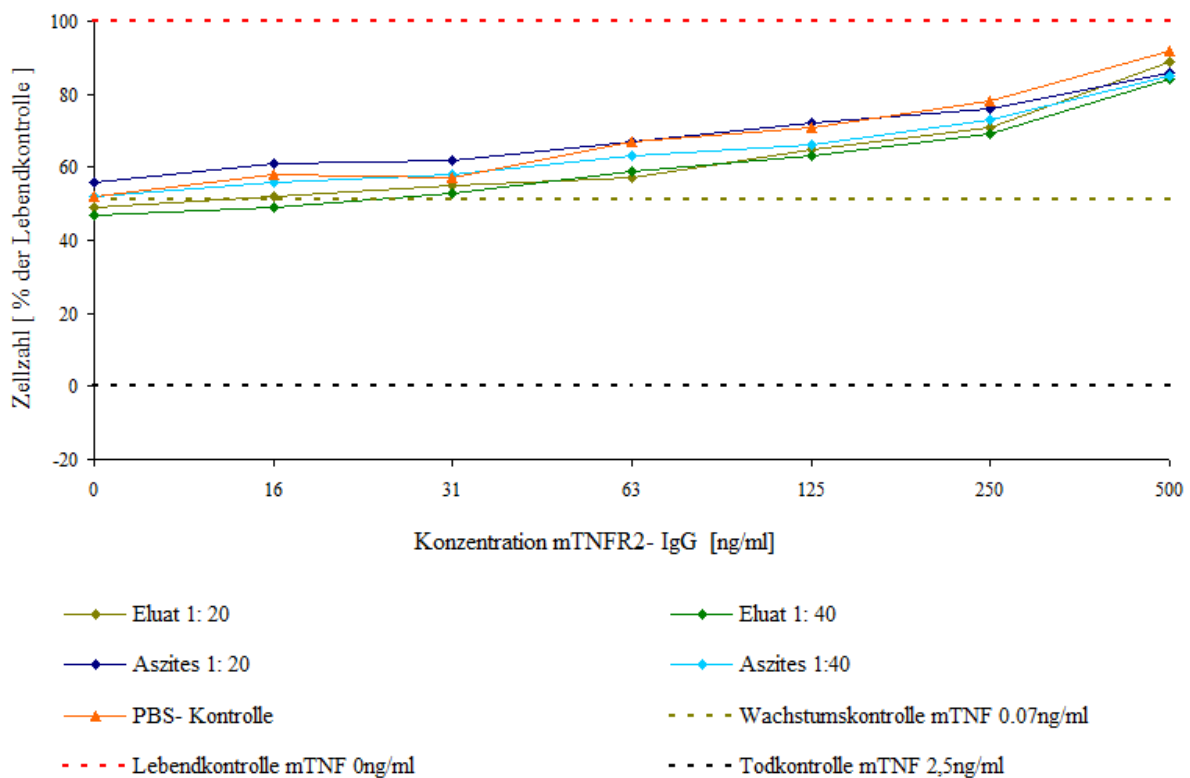


**Abbildung 23: mTNF-induzierte Apoptoserate der L-929-Zellen in Anwesenheit löslicher mTNFR2-Proteine.**

Das mTNF (0,07 ng/ml) wurde für 2 h mit dem mTNFR2-IgG bzw. dem mTNFR2-V5-His- Protein vorinkubiert und auf die L-929-Zellen übertragen. Die Anzahl stoffwechselaktiver Zellen wurde nach 24 h mittels MTT – Assay bestimmt. Als Wachstumskontrolle dienten Wells, denen kein Rezeptor zugegeben wurde. Die Lebendkontrolle enthielt Zellen ohne die Zugabe von mTNF und mTNFR2. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus Dubletten der bei 540 nm photometrisch ermittelten Zellviabilität.

In einem nächsten Schritt wurden dann die Eigenschaften des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak auf den löslichen mTNFR2 näher untersucht. Dazu wurden die L-929-Zellen in Anwesenheit von mTNF und mTNFR2 zugleich dem m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak ausgesetzt und die Zellsterblichkeit

bestimmt. Wie in Abbildung 24 dargestellt, wurden die Zellen durch die Zugabe des löslichen mTNFR2 vor dem Zytokin-induzierten Zelltod geschützt. Dabei zeigte sich jedoch in keiner der eingesetzten Konzentrationen des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak eine Beeinflussung der Apoptoserate im Vergleich zur PBS-Kontrolle (orange). In Abwesenheit des Rezeptors (0-Wert) erreichten sowohl die Antikörper-enthaltenden Wells, als auch die PBS-Kontrolle diejenige Apoptoserate der Wachstumskontrolle. Eine blockierende Wirkung des monoklonalen Antikörpers auf den löslichen mTNFR2 konnte somit nicht nachgewiesen werden.



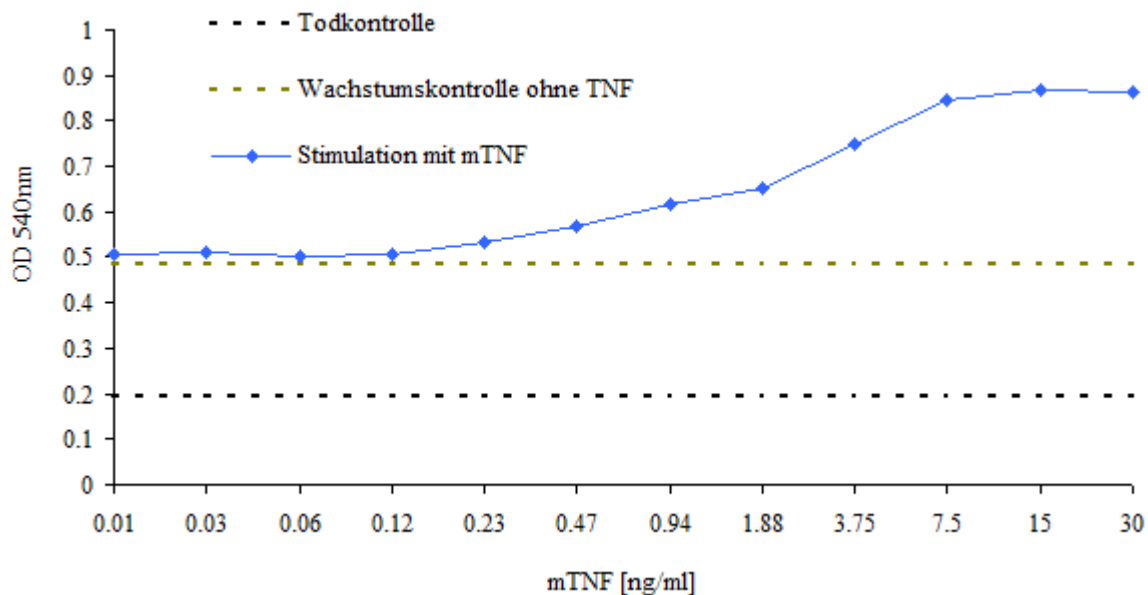
**Abbildung 24: Test hemmender Eigenschaften des Antikörpers auf den löslichen mTNFR2-IgG.**

Die m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak enthaltenden Reagenzien (Eluat, Aszites) wurden in den angegebenen Verdünnungsstufen mit dem mTNFR2-IgG für 2 h vorinkubiert und auf die L-929-Zellen übertragen. Die weitere Kultivierung erfolgte nach Zugabe von mTNF (0,07 ng/ml) in Actionomycin-D-haltigem Medium (2  $\mu$ g/ml) für 24 h. Die Zellviabilität wurde photometrisch über die Umsetzung des Farbstoffes MTT zu Formazan ermittelt. Die PBS-Kontrolle enthielt keine Antikörper. Als Wachstumskontrolle dienten Wells, denen eine identische Menge an mTNF (0,07 ng/ml), aber kein Rezeptor zugegeben wurde. Die Lebendkontrolle enthielt kein mTNF, die Todkontrolle eine absolut toxische mTNF-Menge (2,5 ng/ml). Dargestellt sind die photometrisch bei 540 nm ermittelten Zellviabilitäten.

### 3.2.5 Testung blockierende und aktivierende Eigenschaften im Bioassay mit der cytotoxischen CT-6-Zelllinie

Zur Beurteilung möglicher agonistischer oder antagonistischer Eigenschaften des monoklonalen Antikörpers wurde eine CT-6 –Zelllinie verwendet, die durch die TNF-induzierte Stimulation des membranständigen mTNFR2 hin proliferiert.

Wie in Abbildung 25 dargestellt erhöhte sich die Proliferationsrate der Zellen ab einer zugegebenen mTNF-Menge von ~0,23 ng/ml. Ein wachstumssteigernder Effekt war bis zu einer mTNF-Konzentration von 7,5 ng/ml sichtbar, danach konnte die Proliferationsrate durch erhöhte Zytokin-zugabe nicht mehr weiter gesteigert werden. Das Wachstum der Zellen in Abwesenheit von TNF lag deutlich niedriger (Wachstumskontrolle).



**Abbildung 25: mTNF-abhängige Proliferation der CT-6-Zellen.**

Die CT-6-Zellen wurden in IL-2 haltigem Medium auf einer Mikrotiterplatte ausgesät und mit einer logarithmischen Verdünnungsreihe an mTNF über 48 h inkubiert. Die Wachstumskontrolle zeigt das Zellwachstum in Abwesenheit von mTNF. Die Proliferationssteigerung wurde mittels MTT-Assay und über eine Absorptionsmessung im Photometer bei 540 nm ermittelt. Die Ordinate zeigt die ermittelten optischen Dichten (OD) der Proben, auf der Abszisse sind die eingesetzten mTNF-Konzentrationen angegeben.

Um den Einfluss des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak auf die Wachstumsrate der Zellen besser beurteilen zu können, wurde zur Durchführung aller weiteren Versuche eine mTNF- Konzentration von 0,75 ng/Well gewählt, die im Bereich zwischen maximaler und minimaler Stimulation lag. Antagonistische Eigenschaften des monoklonalen Antikörpers auf den zellständigen mTNFR2

wurden überprüft, indem die Zellen zeitgleich mit dem mTNF und den m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak inkubiert wurden. Da beide Reagenzien den mTNFR2 als Zielstruktur haben, wäre im Falle einer durch den Antikörper verursachten Rezeptorblockade die Bindung des TNF-Liganden an seinen Zielrezeptor unterbunden. Der Wachstums-steigernde Effekt des Zytokins auf die Zellpopulation würde damit verringert oder ginge sogar ganz verloren.

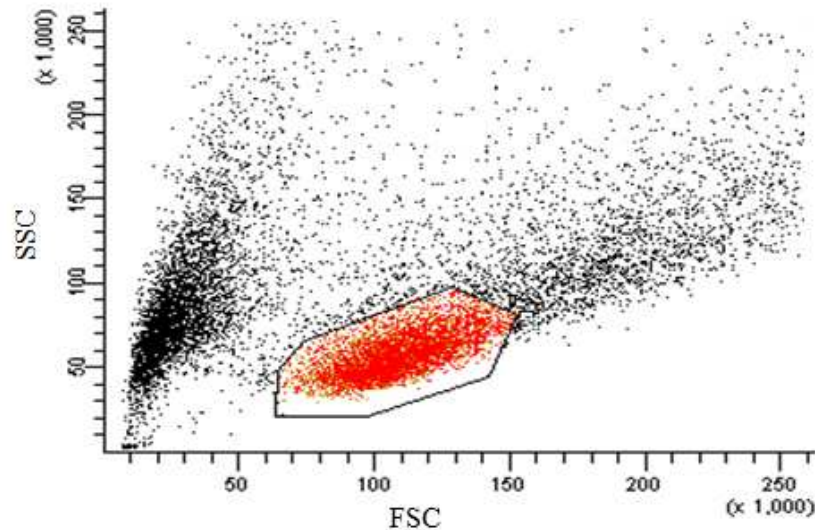
Eine Antikörper-induzierte Blockade der TNF-Bindung an den mTNFR2 zeigte sich jedoch nicht. Die Zugabe der Antikörper-enthaltenden Reagenzien (Hybridomaüberstand, Eluat, Aszites) führte zu keiner Hemmung der Ligandenbindung an den Rezeptor, sodass das Zellwachstum demjenigen der PBS-Kontrolle entsprach (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Versuchsansatz wurden dann mögliche aktivierender Eigenschaften des Antikörpers auf den mTNFR2-Rezeptor in Abwesenheit von mTNF untersucht. Auch hier führte die Antikörperzugabe zu keiner Aktivierung des Rezeptors im Sinne einer Proliferationssteigerung der Zellen, sodass die Wachstumsrate in Anwesenheit des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak derjenigen der PBS-Kontrolle entsprach (Daten nicht gezeigt).

### **3.2.6 Durchflusszytometrische Bindungsanalyse des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak an den mTNFR2 transfizierter CHO-Zellen**

Nun wurde der m- $\alpha$ -mTNFR2-Antikörper auf seine Fähigkeit hin untersucht, an den zellständigen mTNFR2 transfizierter CHO-Zellen (CHO tg) zu binden. Dazu wurden die Zellen mit dem gereinigten Hybridomaüberstand inkubiert und mit einem FITC-markierten  $\alpha$ -mouse-IgG-Antikörper für die Durchflusszytometrie gefärbt. Als Kontrolle dienten CHO-Wildtyp-Zellen (CHO wt), die nicht transfiziert waren und den mTNFR2 nicht auf ihrer Oberfläche trugen. Wie in Abbildung 26 gezeigt, wurde zunächst die Zellpopulation der lebenden CHO-Zellen identifiziert (Lebendzellgate).

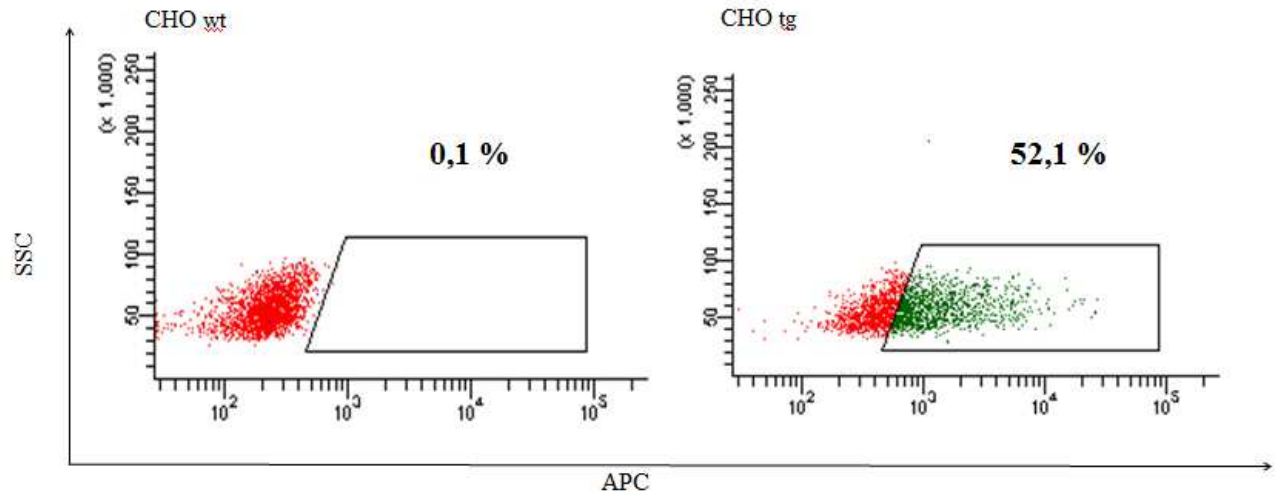




**Abbildung 26: Lebendzellgate der CHO-Zellen.**

Durch die Auswahl der Lebendzellpopulation im Zählfenster (*gate*) wurden nur Messwerte aus diesen definierten Teilbereichen erfasst. Tote Zellen und Zellschrott gingen nicht in die Ergebnisse ein.

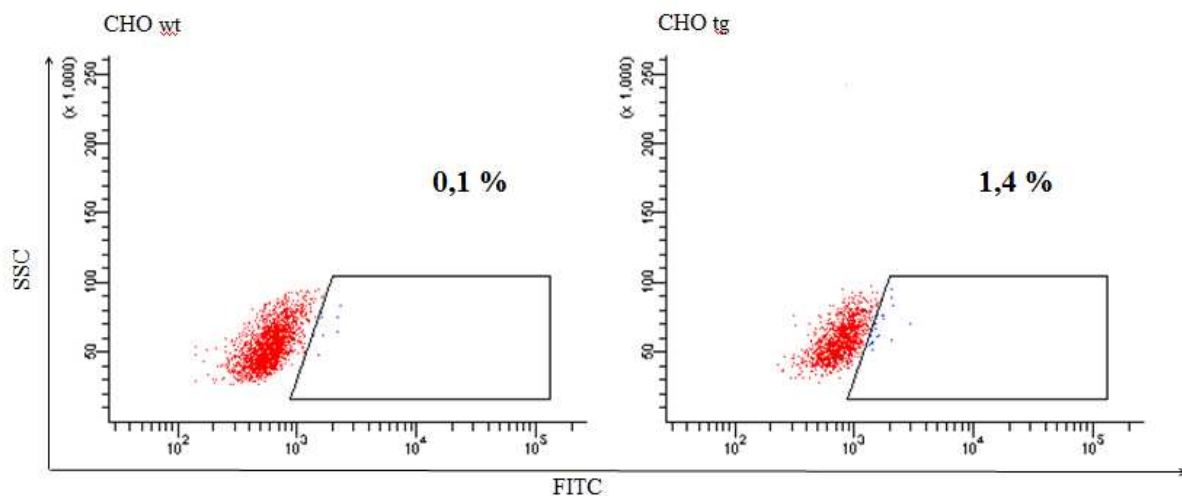
Um den Anteil der den mTNFR2 exprimierenden Zellen in der CHO tg Zellpopulation zu bestimmen, wurden die Zellen mit einem gegen den mTNFR2-gerichteten, kommerziell erhältlichen  $\alpha$ -mouse-CD120b-Antikörper angefärbt. Dieser, mit dem AF647-Flouorchrom markierte Antikörper lieferte sein positives Signal im APC-Kanal. Dabei zeigte sich, dass 52,1 % der CHO tg-Zellen den mTNFR2 auch tatsächlich auf ihrer Zelloberfläche trugen, während der Rezeptor auf der Wildtyp-Kontrolle (CHO wt) nicht nachzuweisen war (Abb.27).



**Abbildung 27:** Durchflusszytometrische Analyse des Anteils an mTNFR2 auf CHO wt-Zellen und CHO tg-Zellen.

Zur Detektion mTNFR2-exprimierender Zellen wurde der AF647-markierte  $\alpha$ -mouse-CD120b-Antikörper eingesetzt, der sein Signal im APC-Kanal liefert.

Die Bindung des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak an die CHO-Zellen wurde mit Hilfe des FITC-markierten  $\alpha$ -mouse-IgG-Antikörpers durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei zeigte sich in der CHO tg-Zellpopulation ein Signal von 1,3 %, das gegenüber der Wildtyp-Kontrolle (CHO wt) nur minimal erhöht war (Abb. 28). Eine Bindung des monoklonalen Antikörpers an den zellständigen mTNFR2 der CHO tg konnte somit nicht eindeutig nachgewiesen werden.



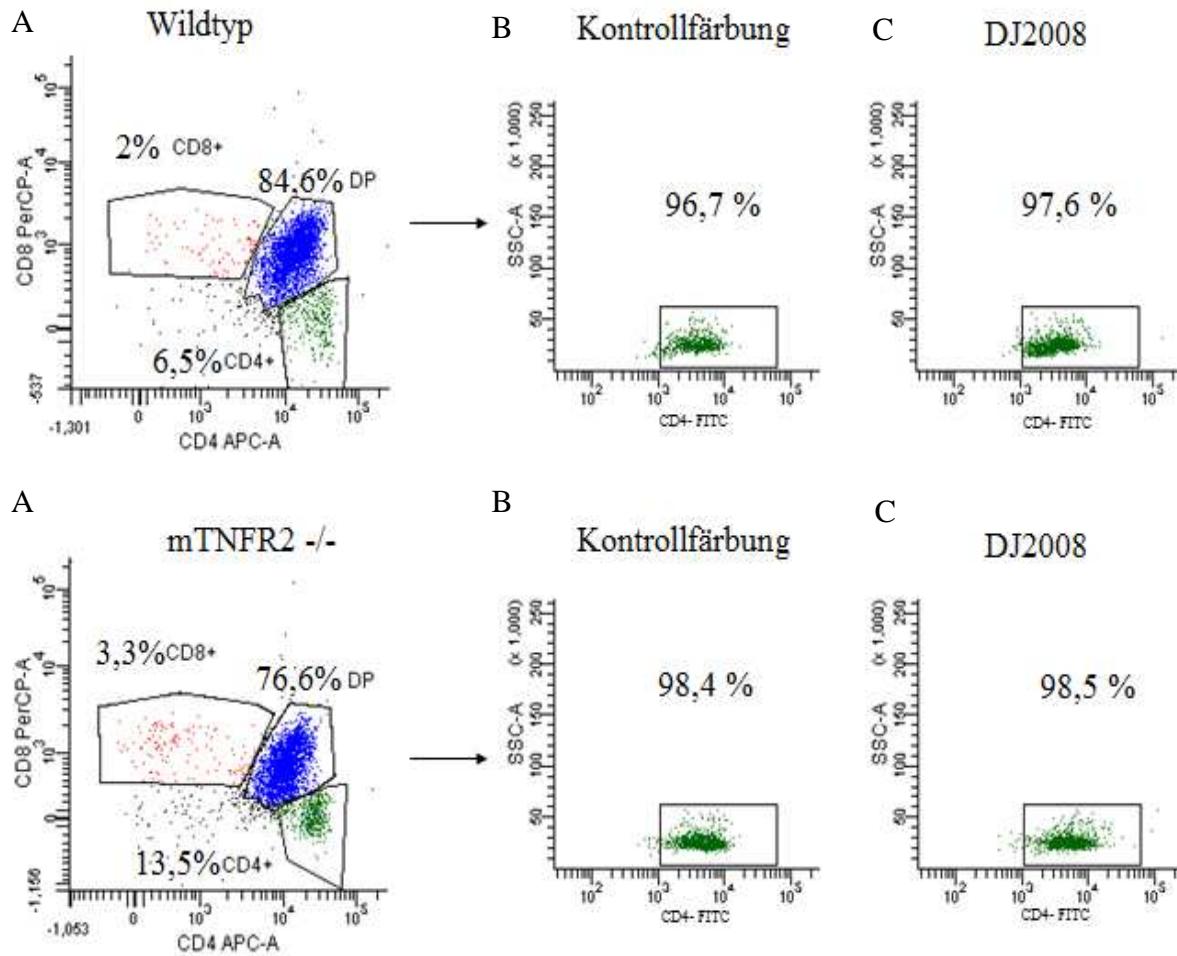
**Abbildung 28:** Durchflusszytometrische Analyse der Bindung des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak an die Zellen.

Die CHO wt und CHO tg Zellen wurden 1 h mit dem Hybridomaüberstand inkubiert. Zur Detektion gebundener Antikörper wurde der FITC-markierte  $\alpha$ -mouse-IgG-Antikörper verwendet.

### 3.2.7 Durchflusszytometrische Bindungsanalyse an die T-Zellen aus Milz und Thymus der Maus

Um die Bindungsfähigkeit des monoklonalen Antikörpers an den zellständigen, nativen mTNFR2 weiter zu untersuchen, wurden aktivierte T-Lymphozyten aus Milz und Thymus der Maus gewonnen und für die Durchflusszytometrie gefärbt. Die Milz- bzw. Thymuszellen wurden wie in Kap.2.2.1.7 beschrieben, mit einem festphasengebundenen  $\alpha$ -CD3-Ak und dem löslichen  $\alpha$ -CD28-Ak über 48 h stimuliert und anschließend mit dem m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak versetzt. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mit dem FITC-markierten  $\alpha$ -mouse-IgG-Antikörper.

In Abbildung 29A ist die oberflächenspezifische Färbung der Subpopulationen im Thymus der Wildtyp- bzw. mTNFR2<sup>-/-</sup> Maus dargestellt, die mittels  $\alpha$ -CD4 und  $\alpha$ -CD8-spezifischer Antikörper durchgeführt wurde. Bei der Wildtypmaus zeigten sich 2% an CD8<sup>+</sup>, 6,5% an CD4<sup>+</sup> und 84,6% an CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> doppelt positiven (DP) Thymozyten. Die Analyse der Thymuszellen der mTNFR2<sup>-/-</sup> Maus ergab einen Anteil von 3,3% an CD8<sup>+</sup>, 13,5% an CD4<sup>+</sup> und 76,6% an CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> doppelt positiven Zellen. Wie in Abbildung 29B für die CD4<sup>+</sup>-Subpopulation der Thymozyten gezeigt, ergab die Kontrollfärbung mit dem alleinigen Sekundärantikörper eine nahezu vollständige Anfärbung der gesamten Zellpopulation mit 96,7% bzw. 98,4%. Dadurch war eine weitere Beurteilung der Bindungsfähigkeit des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak DJ2008 an die T-Zellen nicht möglich (Abb. 29C).



**Abbildung 29: Durchflusszytometrische Färbung der Thymozyten zum Nachweis einer m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak-Bindung an den mTNFR2 der T-Zellen.**

A) Die T- Zell-Subpopulationen im Thymus der Maus wurden mit  $\alpha$ -CD4- und  $\alpha$ -CD8-Antikörpern zellspezifisch angefärbt. B) Kontrollfärbung der CD4<sup>+</sup>-Population mit dem FITC-markierten  $\alpha$ -mouse-IgG-Antikörper ergab eine nahezu vollständige Anfärbung der gesamten Zellpopulation. C) Inkubation der T-Zellen mit dem m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak und Nachweis gebundener Ak durch den FITC-markierten  $\alpha$ -mouse-IgG-Antikörper.

## 4 Diskussion

### 4.1 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen den mTNFR2

Der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) ist ein multifunktionales Zytokin, das zahlreiche biologische Prozesse wie die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und die Apoptose steuert. Als Signalstoff des Immunsystems gilt TNF als einer der wichtigsten Mediatoren der lokalen und systemischen Entzündungsprozesse und ist an der Abwehr zahlreicher Krankheitserreger maßgeblich beteiligt. Auch in der Entwicklung sekundärer lymphatischer Organe und der Aufrechterhaltung der lymphoiden Strukturen konnte die große Bedeutung des TNF bereits belegt werden (Hehlhans und Pfeffer, 2005; Kruglov et al., 2008; Wajant et al., 2003). Diese pleiotropen Funktionen des Zytokins werden über die beiden transmembranständigen Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 vermittelt. Während die über den TNFR1 regulierten Stoffwechselschritte bereits weitgehend aufgeklärt sind, ist die genaue Funktion und Wirkungsweise der über den TNFR2-initiierten Signalkaskaden immer noch ungeklärt.

Zur genaueren Charakterisierung der immunologischen Vorgänge, die über den TNFR2 gesteuert werden, sind die Bestrebungen zur molekularen Untersuchung dieses Rezeptors seit jeher groß. Ein möglicher Ansatz zur Erforschung der TNFR2-abhängigen Signalwege ist der Einsatz von Antikörpern, die spezifisch gegen den jeweiligen TNF- Rezeptor gerichtet sind. In den Untersuchungen von Brockhaus et al. (1990) gelang es mit Hilfe monoklonaler Antikörper das Vorliegen zweier unterschiedlicher TNF- Rezeptoren (TNFR1 und TNFR2) auf verschiedenen menschlichen Zelllinien nachzuweisen. Shalaby et al. (1990), sowie Espevik et al. (1990) charakterisierten in weiteren Studien die biologischen Effekte einer Antikörperbindung an die jeweiligen humanen TNF- Rezeptoren. Grell et al. (1995) fand mit Hilfe des gegen den hTNFR2-gerichteten monoklonalen Antikörpers 80M2 heraus, dass der TNFR2 vor allem durch die membrangebundene Form des TNF-Moleküls aktiviert wird und die vielfältigen TNF- Effekte durch eine unterschiedliche Sensitivität der Rezeptoren für die lösliche bzw. membrangebundene TNF- Form bedingt werden. In den Arbeiten von Tartaglia et al. (1991) kamen polyklonalen Kaninchenserum zum Einsatz, die gegen die murinen TNF- Rezeptoren gerichtet waren und so deren unterschiedliche Funktionen im Mausmodell aufzuklären versuchten. Dabei zeigte sich, dass das Signal zur Proliferation der Thymozyten und cytotoxischen T-Zellen in erster Linie über den TNFR2 vermittelt wird, während der TNFR1 den Zelltod und das Zellüberleben steuert. Außerdem ließ sich nachweisen, dass das TNF-Molekül selbst nicht für die Signalübertragung notwendig ist. Sheehan et al. (1995) erzeugte durch die Immunisierung armenischer Hamster erstmals monoklonale Antikörper

gegen den mTNFR1 und den mTNFR2. Durch den Einsatz der mAk konnte eine bisher unbekannte Rolle des TNFR2, die er in der Entstehung entzündlicher Hauterkrankungen spielt, beobachtet werden.

Da es jedoch in keiner der bisherigen Untersuchungen gelang, einen monoklonalen Antikörper gegen den mTNFR2 im Organismus der Maus herzustellen, der durch agonistische oder antagonistische Eigenschaften eine genauere Erforschung der TNFR2- regulierten Signalkaskaden ermöglichte, war es Gegenstand dieser Arbeit einen solchen „Maus- $\alpha$ -Maus“-Antikörper herzustellen und ihn im Hinblick auf seine funktionellen Eigenschaften näher zu charakterisieren. Ein solcher Antikörper mit blockierenden oder aktivierenden Eigenschaften wäre ein geeignetes Werkzeug, um im Tiermodell durch eine gezielte Rezeptorstimulation oder Blockade dessen Funktionen grundlegend zu erforschen.

Um monoklonale Antikörper gegen den mTNFR2 in der Maus generieren zu können, wurden mTNFR2<sup>-/-</sup> Mäuse verwendet, bei denen das entsprechende Gen für das mTNFR2-Protein durch genetische Manipulation deaktiviert wurde. Die Injektion des mTNFR2-V5-His-Antigen (Abb.6) sollte zu einer Aktivierung des Immunsystems und zur Bildung spezifischer, gegen das Fremdprotein gerichteter Antikörper führen. Um diese Reaktion zu verstärken, wurde das Antigen gemeinsam mit dem Freud'schem Adjuvans appliziert, das zu einer lokalen Entzündungsreaktion führt und so die Immunogenität des Antigens erhöht (Harlow, 1988; Holländer, 2006).

Wie sich im Titertest der polyklonalen Mausseren zeigte, konnte bereits nach der ersten Booster-Injektion eine adäquate Immunreaktion erzielt werden (Abb.14A), die durch die zweite Booster-Injektion noch gesteigert wurde (Abb.14B).

Nach der Zellfusion der Milzzellen mit den Myelomazellen war in 83,4 % der Wells ein Hybridomazell-Wachstum zu beobachten. Es zeigte sich jedoch, dass ein Grossteil der im ELISA als positiv getesteten Zellklone ihre Antikörperproduktion nach einigen Wochen einstellten. Der dauerhaft in Kultur genommene Hybridomazellklon IX E5 überlebte nur in einem von Peritonealmakrophagen konditionierten Medium. Das gute Wachstum in Anwesenheit der Phagozyten lässt sich dadurch erklären, dass diese sowohl apoptotische Zellen, als auch entstandenen Zelldebris aus dem Kulturmedium entfernen und so die Wachstumsbedingungen für die fusionierten Zellen optimieren (Campbell, 1984). Außerdem ist in der Literatur beschrieben, dass die PEC Wachstumsfaktoren ausschütten, die ein für die klonale Expansion der Hybridomazellen günstiges Milieu schaffen (Rathjen und Geczy, 1986; Sugawara et al., 1985).

Nach mehreren Subklonierungen konnte der stabil wachsende monoklonale Zellklon DJ2008 etabliert werden, der kontinuierlich monoklonale Antikörper gegen den mTNFR2 der Subklasse IgG<sub>1</sub> $\kappa$  produzierte (Abb.16).

#### 4.2 Spezifitätstestung im ELISA-, Dot Blot- und Western Blot-Verfahren

Zur weiteren Spezifitätstestung wurde der mAk in verschiedenen Verfahren wie dem ELISA, dem Dot Blot, dem Western Blot und der Durchflusszytometrie eingesetzt.

Da in der Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers das Selektionssystem eine besonders wichtige Rolle spielt, muss das Testsystem äußerst spezifisch und empfindlich in der Detektion des Zielproteins sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum Screening der Hybridomazellen auf die gewünschte Antikörper-Produktion hin das ELISA-Verfahren angewandt. Das mit dem IgG-*tag* markierte Protein mTNFR2-IgG wurde an die Mikrotiterplatte immobilisiert und zur Spezifitätstestung der Antikörper eingesetzt. Durch den Einsatz beider, mit unterschiedlichen *tags* markierter Antigene (-IgG bzw. -V5-His) in der 3. Titertestung konnte gezeigt werden, dass es wichtig ist, für die Selektion der Antikörper ein anderes Antigen zu verwenden, als es für die Immunisierung zum Einsatz kam (Abb.15). Es stellte sich hierbei heraus, dass 10 der 16 getesteten Antikörper an das mTNFR2-V5-His banden, ohne auch an das mTNFR2-IgG ausreichend zu binden. Daher musste davon ausgegangen werden, dass diese Antikörper an eine andere Domäne des Immunisierungsproteins binden und nicht spezifisch für das mTNFR2-Epitop sind.

Die Spezifität der m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak zur Detektion von nativem und denaturiertem Rezeptorprotein wurde dann im Dot Blot-Verfahren überprüft. Von den sechs im ELISA als positiv getesteten Hybridomaüberständen (VI E2, VI F9, VIII E4, IX E5, XI E10, XI D4) erkannten lediglich drei (IX E5, XI D4, XI E10) auch das auf der Nitrozellulosemembran immobilisierte Antigen. Der Klon VI F9 reagierte unspezifisch mit dem Milchpulverprotein der Blockierlösung und führte zu einer Anfärbung der gesamten Membran. Der Klon IX E5 zeigte die höchste spezifische Bindungsstärke, da er selbst eine 10-fach niedrigere Antigenmenge noch detektierte (Abb.17). Alle der drei bindenden Antikörper erkannten die native Form des Antigens besser als die denaturierte Form, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass sich mit der Denaturierung des Proteins auch stets dessen dreidimensionale Struktur verändert. Damit kann auch die Zugänglichkeit des Antikörpers für das Epitop beeinträchtigt werden und so dessen Bindungsfähigkeit erniedrigen (Janeway, 2007).

Die weitere Bindungsanalyse des Klon DJ2008 erfolgte im Western Blot-Verfahren unter Einsatz beider denaturierter Rezeptorproteine mTNFR2-V5-His und mTNFR2-IgG.

Dabei zeigten sich in der Detektion des mTNFR2-IgG-Proteins Spaltprodukte unterschiedlicher Molekulargewichtsbereiche (Abb. 18, Abb. 19). Aufgrund der Tatsache, dass diese Bandenfärbung bei allen verwendeten Chargen auftrat und stets die gleichen Peptidfragmente nachweisbar waren, musste von einer Fragmentierung des bei -80 °C gelagerten und für den jeweiligen Versuchseinsatz erneut aufgetauten Protein ausgegangen werden. Diese Vermutung wurde auch dadurch untermauert, dass das von der Arbeitsgruppe neu in DS-2-Zellen synthetisierte Rezeptorprotein wieder das theoretische Molekulargewicht des Gesamtproteins erreichte. Dass die Fragmentierung des Proteins jedoch keinen Einfluss auf dessen Funktionalität hatte, zeigte sich in den Bioassays, in denen die Fähigkeit des mTNFR2-IgG zur Ligandenbindung erhalten blieb (Abb. 23). Die Spezifität des monoklonalen Antikörpers für sein Epitop konnte also durch die Detektion des mTNFR2-IgG- und mTNFR2-V5-His-Protein im Western Blot gezeigt werden (Abb. 18).

Als weiterer Schritt wäre nun der Nachweis des nativen mTNFR2 durch den monoklonalen Antikörper in der Westernblotanalyse wünschenswert. Durch den Einsatz eines Zelllysats aus mTNFR2-exprimierenden Zellen im Western-Blot-Verfahren könnte so die Bindungsfähigkeit des DJ2008 auch an die native Form des mTNFR2 überprüft werden.

#### **4.3 Durchflusszytometrische Analyse einer Antikörperbindung an den mTNFR2 transfizierter CHO-Zellen**

Nachdem die Spezifität des monoklonalen Antikörpers für das rekombinante mTNFR2-Protein im ELISA, im Dot Blot und im Western Blot gezeigt werden konnte (Abb. 15, Abb. 17, Abb. 18) wurde die Bindung an den zellständigen mTNFR2 durchflusszytometrisch überprüft. Dazu wurden die mit dem mTNFR2-transfizierten CHO tg -Zellen verwendet, auf denen der Rezeptor in 52,1 % der Zellpopulation mit dem käuflichen  $\alpha$ -mouse-CD120b-Ak nachzuweisen war (Abb.27). Nach Inkubation der Zellen mit dem m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak wurde der Anteil gebundener Antikörper an die CHO tg mit 1,4 % bestimmt (Abb. 28).

In den bisher durchgeführten Testverfahren wie dem ELISA-, dem Dot Blot- und dem Western Blot-Verfahren wurde stets das rekombinante Rezeptorprotein eingesetzt, sodass es durchaus denkbar ist, dass der gewonnene Antikörper nur dieses künstliche Epitop mit ausreichender Affinität bindet, den auf den vitalen Zellen exprimierten Rezeptor jedoch nicht erkennt. Möglich wäre außerdem, dass die in dem verwendeten Hybridomaüberstand vorliegende Antikörperkonzentration nicht hoch genug war, um eine durchflusszytometrisch



detektierbare Antikörperbindung hervorzurufen. Diese Hypothese wird auch dadurch bestätigt, dass in einem von der Arbeitsgruppe weitergeführten Experiment die Bindung des Antikörpers an die CHO tg Zellen unter Verwendung sehr hoher Antikörperkonzentrationen, wie sie etwa durch das Aszites-Verfahren gewonnen wurden, durchflusszytometrisch nachweisbar war. Während in der Zellkultur nur relativ geringe Antikörperkonzentrationen bis zu maximal 20 µg/ml gewonnen werden können, gibt es einige Verfahren, die eine wesentlich effizientere Antikörperproduktion ermöglichen (Peterson und Peavey, 1998; *Institute for Laboratory Animal Research*, 1999). Bei dem Aszites-Verfahren handelt es sich um eine in vivo-Methode, in der Mäuse mit den entsprechenden Hybridomazellen intraperitoneal beimpft werden. Diese Zellen können sich dann weiter teilen und große Mengen an monoklonalen Antikörpern in die Bauchhöhle sezernieren, die den sogenannten Aszitestumor bilden. Dieser wird geerntet um die enthaltenen monoklonalen Antikörper dann aufzureinigen und zur weiteren Verwendung anderen Verfahren zuzuführen (Coligan, 1991). Eine Steigerung der Antikörperproduktion auf mehrere mg/ml kann außerdem durch die Verwendung eines semipermeablen Bioreaktors erzielt werden (z.B. Membran-Bioreaktor CELLline, Firma Sartorius Stedim Biotech). Durch das Zweikammer-System wird eine Konzentrierung der Antikörper in der Zellkammer erreicht, während toxisch wirksame Metabolite in die Medienkammer abdiffundieren und regelmäßig entfernt werden können.

#### **4.4 Durchflusszytometrische Analyse einer Antikörperbindung an den mTNFR2 stimulierter T-Zellen aus Milz und Thymus der Maus**

Die T-Zellen sind wesentlicher Bestandteil der adaptiven Immunantwort, da sie neben der zellvermittelten Immunantwort über eine Sekretion von Zytokinen auch die humorale Immunantwort steuern. Um die T-Zellen vollständig zu aktivieren und eine effektive Immunreaktion zu generieren, ist sowohl die Stimulierung des T-Zell-Rezeptors (TCR), als auch seiner Co-Rezeptoren notwendig. Während über den TCR eine Antigen-spezifische Aktivierung der T-Zellen stattfindet, wird über die membrangebundenen, co-stimulatorischen Moleküle die Proliferation und die Differenzierung der T-Zellen weiter moduliert (Abbas et al., 2007). Zu diesen auf den T-Zellen exprimierten Co-Rezeptoren gehören neben dem CD28-Molekül auch die Mitglieder der TNFR-Familie (Croft, 2003; Rothstein und Sayegh, 2003). In zahlreichen Studien konnte dabei vor allem dem TNFR2 eine herausragende Rolle als Co-Stimulans zugeschrieben werden, da es erst durch die gemeinsame Aktivierung mit dem TCR und dem CD28-Molekül zu einer vollständigen Aktivierung der T-Zellen kam (Aspalter et al., 2003; Kim und Teh, 2001; Kim und Teh, 2004). Diese wichtige Funktion des

TNFR2 als Costimulans für eine vollständige T-Zell Aktivierung konnte auch im Mausmodell bestätigt werden (Kim et al., 2006). Da bekannt ist, dass der mTNFR2 sowohl auf den CD4<sup>+</sup>, als auch auf den CD8<sup>+</sup> Lymphozyten und dabei vor allem auf der Subpopulation der CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, den regulatorischen T-Zellen (T-regs) exprimiert ist, wurde die Bindung des monoklonalen Antikörpers an den mTNFR2 der T-Zellen aus Milz und Thymus durchflusszytometrisch untersucht (Annunziato et al., 2002; Chen et al., 2007). Um die Expression des mTNFR2 auf den T-Lymphozyten zu erhöhen, wurden die Zellen über ihren T-Zellrezeptor mit dem  $\alpha$ -CD3- und dem  $\alpha$ -CD28-Antikörper stimuliert (Bisikirska et al., 2005; Chen et al., 2007; Kim et al., 2004).

Zum Nachweis gebundener m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak wurde der FITC-markierte  $\alpha$ -mouse-IgG-Antikörper als Sekundärantikörper verwendet, der jedoch bereits in der Kontrollfärbung eine starke Bindung an nahezu die gesamte Zellpopulation zeigte (Abb. 29B). Diese unspezifische Anfärbung war sowohl bei Verwendung der Milzzellen, als auch bei den Thymuszellen zu beobachten. Durch die Verwendung von Thymusgewebe, das als Ort der T-Zellreifung nahezu ausschließlich T-Lymphozyten enthält, sollte einerseits die Anzahl an mTNFR2-tragenden Zellen erhöht werden und andererseits die Gefahr unspezifischer Bindungsreaktionen verringert werden. Die starke Färbereaktion des Sekundärantikörpers in der Kontrollfärbung blieb jedoch auch unter Verwendung der Thymozyten unverändert hoch (Abb. 29B).

Mit der CD4- und CD8- spezifischen Oberflächenfärbung konnten die unterschiedlichen T-Zell-Subpopulationen des Thymus identifiziert werden. Es zeigte sich sowohl bei der Wildtyp-Maus, als auch bei der TNFR2<sup>-/-</sup> Maus eine für dieses Organ charakteristische Zusammensetzung der verschiedenen T-Zell-Subpopulationen (Abb. 29). In der Literatur wird der prozentuale Anteil an CD4<sup>+</sup>- Lymphozyten mit ~12 %, der Anteil an CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten mit ~5 % und die Population der doppelt positiven CD4<sup>+</sup>/ CD8<sup>+</sup> Zellen mit ~80 % angegeben (Abbas, 2007; Holländer, 2006), was sich auch in etwa mit den durchflusszytometrisch ermittelten Werten deckt. Damit bestätigte sich auch das Ergebnis bisheriger Studien, die eine normale T-Zell Entwicklung der Thymi TNFR2<sup>-/-</sup> Mäuse beschreiben (Erickson et al., 1994).

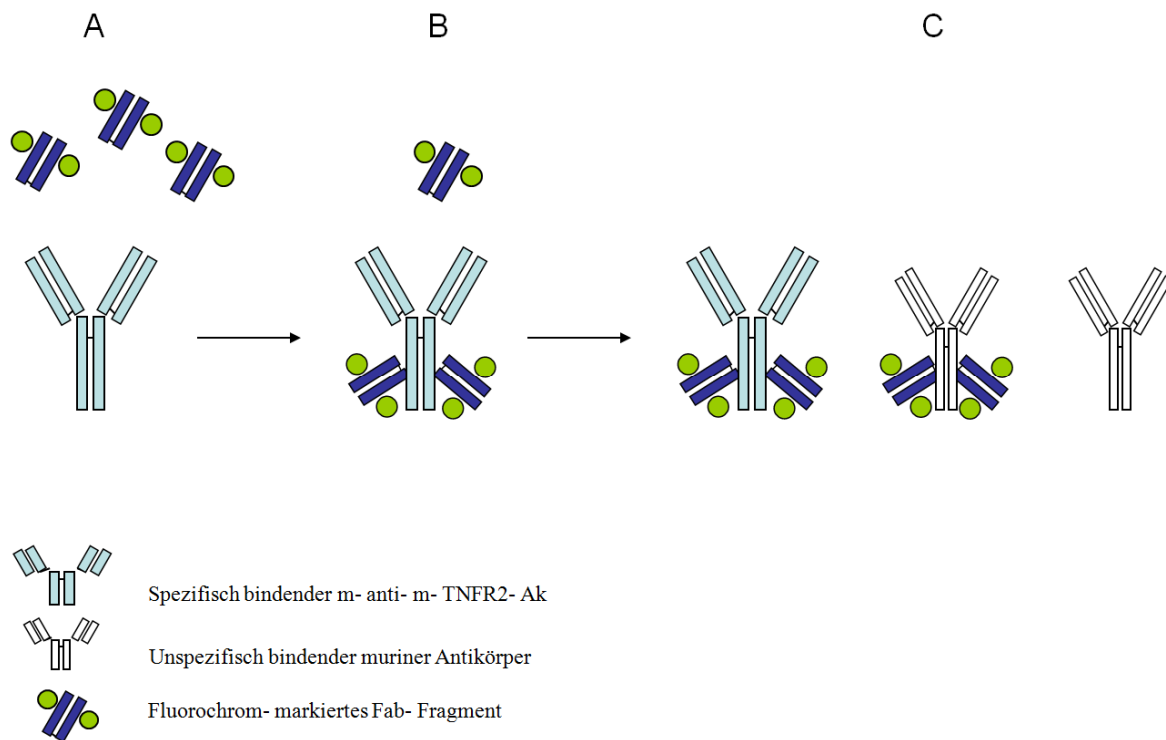
Da das Auftreten unspezifischer Zellfärbungen in der Regel von mehreren Faktoren wie etwa der Inkubationszeit, der Temperatur oder der verwendeten Antikörperkonzentration abhängig ist, sollte zur Minimierung der Hintergrundfärbung die benötigte Antikörperkonzentration in einem Vorversuch ermittelt werden (Darzynkiewicz und Robinson, 2001). Durch eine experimentelle Verdünnungsreihe des FITC-markierten Antikörpers unter Konstanthaltung von Inkubationszeit und Temperatur sollte dann eine maximale Anfärbung der Zielzellen

unter Vermeidung unspezifischer Bindungen angestrebt werden. Da diese starke Hintergrundfärbung jedoch nicht bei den aus dem Hamster stammenden CHO-Zellen zu beobachten war, scheint es sich weniger um ein Problem der richtigen Antikörperkonzentration zu handeln, sondern vielmehr um kreuzreaktive Eigenschaften gegenüber den mäuseichen Oberflächenproteinen. In der Aufbereitung der Zellen für die durchflusszytometrische Färbung wurde eine Blockierung der Fc $\gamma$ -Rezeptoren II und III vorgenommen, um mögliche unspezifische Bindungsstellen, wie sie etwa auf den Phagozyten, den B-Lymphozyten, den natürlichen Killerzellen und den dendritischen Zellen vorkommen, abzusättigen. Im Falle der verwendeten Milzzellen war dieser Schritt besonders wichtig, da es sich dabei um ein lymphatisches Organ handelt, das sich aus einer Vielzahl verschiedenen Zellpopulationen zusammensetzt, von denen viele diese Fc-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen und so den FITC-markierten Sekundärantikörper binden können. Wie sich in der Kontrollfärbung zeigte, war jedoch trotz Fc-Rezeptor-Blockade eine starke Anfärbung der Milzzellen in der Kontrollfärbung zu beobachten.

Durch die Verwendung von Thymozyten, bei denen es sich größtenteils um T-Zellen handelt, die keinen Fc-Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen, bestand die Hoffnung, dass sich dadurch die Hintergrundfärbung verringern würde. Die Kontrollfärbung der Thymozyten zeigte jedoch ebenfalls eine starke unspezifische Anfärbung nahezu aller Zellen. Diese ist vermutlich dadurch zu erklären, dass die Stimulierung der T-Zellen zu einer vermehrten Expression zahlreicher weiterer Oberflächenmoleküle führte, an denen der Sekundärantikörper haften blieb. Außerdem ist bekannt, dass die auf den T-Zellen exprimierten Rezeptoren und Co-Rezeptoren zu den Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie gehören (Abbas, 2007; Janeway, 2007). Als solche besitzen sie zahlreiche strukturelle Homologien, die eine Bindung des gegen mäuseiche Immunglobuline gerichteten Sekundärantikörpers an die Zellen ermöglichen. Durch die Stimulierung der T-Zellen via  $\alpha$ -CD3 und  $\alpha$ -CD28-Antikörper wird die Expression dieser Oberflächenmoleküle noch gesteigert und damit auch die potentielle Kreuzreaktivität des Sekundärantikörpers mit den exprimierten Immunglobulin-Domänen verstärkt. Da eine Bindung des Sekundärantikörpers an alle verwendeten mäuseichen Zellen stattfand, liegt die Vermutung nahe, dass der  $\alpha$ -Maus-IgG-Antikörper mit unterschiedlichen mäuseichen Strukturen kreuzreagiert.

Eine Möglichkeit diese unspezifische Anfärbung durch den Sekundärantikörper zu umgehen, bietet die direkte Konjugation des monoklonalen Antikörpers mit einem fluoreszierenden Farbstoff. Dadurch könnte die Bindungsfähigkeit des monoklonalen Antikörpers an die T-Zellen direkt beurteilt werden. Mit Hilfe käuflich erhältlicher *Monoclonal Antibody-Labeling*

*Kits* (z. B. Firma Serotec) könnten die aufgereinigten m- $\alpha$ -mTNFR2-spezifischen Immunglobuline mit dem gewünschten Fluorochrom-Farbstoff für die Analyse im Durchflusszytometer markiert werden. Eine Methode, mit der auch geringe Antikörpermengen markiert werden können, ist die Verwendung von Fluorochrom-markierten Fab Fragmenten, die gegen die Fc-Domäne des gewünschten Antikörpers gerichtet sind (z.B. *Zenon Mouse-IgG-labeling Kits*, Invitrogen). Durch diese nicht-kovalente Bindung an die Fc-Domäne des Antikörpers bleibt die Antigen-bindende Einheit unbeeinflusst (Abb. 30). Durch dieses sogenannte „*labeln*“ ist nicht nur der direkte Nachweis gebundener Antikörper durchflusszytometrisch möglich, sondern auch die Anzahl an Inkubations- und Waschschritten und damit möglicher Fehlerquellen verringert.



**Abbildung 30:Antikörper-Labeling mit Fluorochrom-markierten Fab-Fragmenten.**

A) Der Primärantikörper wird mit dem Fluorochrom-markierten, Fc-spezifischen  $\alpha$ -IgG-Fab-Fragment inkubiert. B) Das Fluorochrom-markierte Fab-Fragment bindet an die Fc-Region des Maus-IgG. C) Überschüssige Fab-Fragmente werden durch die Zugabe unspezifischer Maus-Immunglobuline neutralisiert.

#### 4.5 Kreuzreaktivität

Da die Bestimmung kreuzreaktiver Eigenschaften ein wichtiger Parameter in der Charakterisierung eines monoklonalen Antikörpers ist, wurde die Kreuzreaktivität des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak gegenüber dem zellständigen mTNFR1 der Fibrosarkomzelllinie L-929 überprüft.

Molekulare Basis von Kreuzreaktionen ist es, dass ein zur Immunisierung eingesetztes Antigen im Organismus eine Immunantwort hervorruft, die zur Antikörperbildung gegen das Epitop oder eine antigene Determinante des Antigens führt. Da dieses Epitop nur einen sehr kleinen Teil eines Antigens umfasst, kommt es vor, dass ein anderes Antigen über ein gleiches Epitop verfügt, was zu Kreuzreaktivitäten des Antikörpers gegenüber diesem Antigen mit ähnlichen Molekularstrukturen, führen kann (Janeway, 2007).

Da alle Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie strukturelle Homologien in ihrem Extrazellulärbereich in Form der cysteinreichen Domänen besitzen (Dembic, 1990; Idriss und Naismith, 2000; Locksley et al., 2001), wurden mögliche kreuzreaktive Eigenschaften des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak mit dem mTNFR1 überprüft. Im Bioassay mit der L-929-Zelllinie konnten diese jedoch ausgeschlossen werden (Abb. 22).

#### 4.6 Aktivierung des mTNFR2

Da der TNFR2 als ein wichtiger co-stimulatorischer Rezeptor der T-Zell-Aktivierung gilt, ist er im Zuge dessen auch an der Steigerung der T-Zell-Proliferation maßgeblich beteiligt (Aspalter et al., 2003; Kim et al., 2004; Tartaglia et al., 1991; Tartaglia et al., 1993a).

Im Mausmodell wurde mit Hilfe von polyklonalen, gegen die beiden TNF-Rezeptoren gerichteten Antikörpern gezeigt, dass nur über eine Aktivierung des mTNFR2, nicht aber über den mTNFR1 die Proliferation von Thymozyten und cytotoxischen T-Zellen stimuliert werden kann (Tartaglia et al., 1991).

In der vorliegenden Arbeit wurde diese TNF-induzierte, über den mTNFR2-vermittelte Wachstumsstimulation mit der cytotoxischen Maus-CT-6-Zelllinie nachvollzogen (Abb. 25). Dazu waren jedoch relativ hohe Konzentrationen im Bereich mehrerer Nanogramm des Zytokins notwendig, um einen messbaren proliferativen Effekt zu erreichen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass das TNF in zweierlei bioaktiven Formen, nämlich der löslichen und der membrangebundenen Variante vorkommt und an die TNF-Rezeptoren mit einer unterschiedlich starken Affinität binden. Da bekannt ist, dass der mTNFR2 vor allem durch die membrangebundene Form des TNF aktiviert wird (Grell et al., 1995; Krippner-

Heidenreich, 2002), ist die Wachstumssteigerung der CT-6-Zellen, die mit der Zugabe des löslichen Liganden erreicht werden kann, relativ gering. Um die über den mTNFR2-vermittelten Signalkaskaden zu verstärken, wäre hier der Einsatz der bereits entwickelten TNF-gekoppelten Nanopartikel von großem Interesse, die die Funktion des membrangebundenen TNF imitieren und so zu einer deutlich stärkeren Aktivierung des mTNFR2 führen (Bryde et al., 2005). Mit der Verwendung dieses Tools, das die Bioaktivität des membrangebundenen TNF besitzt, wären mögliche Effekte des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak auf die Zellproliferationsrate wesentlich besser zu beurteilen.

Weiterhin ist aus Strukturstudien bekannt, dass unter physiologischen Bedingungen für eine Aktivierung des TNF-Rezeptors stets dessen Trimerisierung notwendig ist. Dies geschieht im Organismus durch die Bindung eines trimeren TNF-Moleküls, das dann drei in räumlicher Nähe liegende Rezeptoren quervernetzt (Loetscher et al., 1991). Dieses stöchiometrische Verhältnis von drei Rezeptoren, die von einem trimeren Liganden gebunden werden, ist daher Voraussetzung für die Aktivierung der Rezeptoren und die Auslösung agonistischer Signalkaskaden. Da durch die Bindung eines Immunglobulins mit seinen zwei spezifischen Bindungsstellen nur eine Dimerisierung der Zielrezeptoren möglich ist, reicht dieses Signal möglicherweise nicht für die Auslösung weiterer Signalkaskaden aus. Shalaby et al. (1990) zeigte, dass eine Aktivierung der TNF-Rezeptoren erst nach der Quervernetzung mehrere spezifisch bindender monoklonaler Antikörper möglich ist. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch in einer weiteren Studie gemacht, bei der nach Immunisierung armenischer Hamster Antikörper gegen den mTNFR2 hergestellt wurden und diese auf mögliche agonistische Funktionen hin untersucht wurden. Dabei waren die gewonnenen Antikörper alleine nicht dazu befähigt, das Wachstum der CT-6-Zellen zu induzieren. Erst die Verwendung des polyvalenten  $\alpha$ -mTNFR2-spezifischen Serums bzw. die Kopplung des monoklonalen Antikörpers an ein weiteres  $\alpha$ -Hamster-IgG führte zu einer ausreichenden Aktivierung des mTNFR2 und zur Steigerung der T-Zell Proliferation (Sheehan et al., 1995).

In analoger Weise wäre auch eine funktionelle Modifizierung des hergestellten monoklonalen m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak denkbar. Durch das sogenannte *Cross-linking* kann mittels eines chemischen Reagens zwischen den funktionellen Gruppen zweier Proteine eine kovalente Bindung eingeführt werden (Hermanson, 2007). Mit diesem Verfahren könnte auch der monoklonale Antikörper an ein weiteres Molekül, wie z. B. ein Immunglobulin gekoppelt werden um die Trimerisierung und Aktivierung des Zielrezeptors zu ermöglichen.

Auch die Kopplung des m- $\alpha$ -m-TNFR2-Ak an ein Festphasensystem wie z. B. einer Mikrosphäre, die in der Regel aus einem polymeren Material wie Latex, Polyethylen,

Polypropylen oder Polystyrol besteht, kann die Liganden-Rezeptorbindung erleichtern und zu einer effektiveren Aktivierung des Zielrezeptors führen (Hermanson, 2007; Schiestel et al., 2004).

Dass für eine vollständige Aktivierung des TNFR2 in vitro auch noch zahlreiche andere Faktoren eine Rolle spielen, zeigte die Entwicklung des gegen den hTNFR2 gerichteten monoklonalen Antikörpers 80M2. Dieser zeigte nur in Gegenwart von löslichem TNF (sTNF) eine agonistische Aktivität gegenüber seinem Zielrezeptor, da dadurch der Rezeptor-Liganden-Komplex ausreichend stabilisiert wurde (Grell et al., 1995; Krippner-Heidenreich, 2002).

Neueste Studien gaben einen Hinweis darauf, dass für die Aktivierung der TNF-Rezeptoren auch noch weitere Faktoren, wie etwa die Fähigkeit zur Cluster-Bildung, die Seitwärtsdiffusion der Moleküle, oder auch der minimal notwendige Liganden-Abstand eine Rolle spielen (Ranzinger et al., 2009)

#### **4.7 Blockierung des mTNFR2**

Im Weiteren wurde der monoklonale Antikörper DJ2008 im TNF-Bioassay auf antagonistische Eigenschaften hin überprüft. Im Falle blockierender Eigenschaften des Antikörpers würde die Zugänglichkeit des Rezeptors für seinen physiologischen Liganden gehemmt und so die jeweilige TNF-vermittelte Signalkaskade verhindert werden. Im CT-6-Proliferationsassay hatte eine Antikörperzugabe jedoch keinen Einfluss auf das TNF-abhängige Zellwachstum (Kap.3.2.5).

Diese Beobachtung, dass der Antikörper zu keiner Blockierung der Rezeptorfunktion führt, war auch im TNF-induzierten Zytotoxizitätstests mit der L-929-Zelllinie nachzuvollziehen. Im Versuchsansatz war durch die Zugabe des löslichen mTNFR2-IgG-Proteins ein deutlicher Schutz der Zellen vor dem mTNF-induzierten Zelltod zu erreichen (Abb.23). Dieses Ergebnis deckt sich auch mit den Untersuchungen von Peppel et al. (1991), die in ähnlicher Weise ein chimäres Protein einsetzten, das aus der extrazellulären Domäne des humanen TNF-Rezeptors bestand, an die eine Fc-Domäne eines Maus-Immunglobulins gekoppelt war. Es zeigte sich auch hier, dass der Einsatz eines dimeren Rezeptor-Konstrukts die TNF-Aktivität antagonisieren konnte.

Wie in Abbildung 24 gezeigt, blieb der neutralisierende Effekt des zugegebenen chimären Rezeptorproteins auf das TNF jedoch auch nach Zugabe des m- $\alpha$ -mTNFR2-AK erhalten.

Diese Datenlage gibt zwar derzeit keinen Hinweis auf einen funktionellen Agonismus oder Antagonismus des generierten m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak, zur genaueren Validierung der Antikörperfunktion sind jedoch weitere experimentelle Untersuchungen notwendig.

#### **4.8 Mögliche Einsatzgebiete des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak in Forschung und Diagnostik**

Da eine fehlgesteuerte TNF Produktion sowohl im Falle einer Überproduktion, als auch eines Mangels, zahlreiche entzündliche und autoimmunologische Krankheiten bedingt, ist dieses Zytokin eine beliebte Zielstruktur in der immunologischen Forschung. Da TNF ein multifunktionaler Signalstoff des Immunsystems ist, ergeben sich mit dem therapeutischen Eingriff in das TNF/TNFR-System jedoch stets zahlreiche Effekte, die für Patienten oft zu schwerwiegenden Nebenwirkungen einer anti-TNF-Therapie führen.

Je nach Krankheitsursache ist daher eine spezifische und gezielte Modulation der pathophysiologisch ursächlichen Signalkaskaden von grundlegender Bedeutung. Damit könnte nicht nur die Erforschung der Krankheitsentstehung, sondern in einem weiteren Schritt auch die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien von großem Nutzen sein. Die Bestrebungen zur Aufklärung der über die beiden TNF-Rezeptoren vermittelten Funktionen, sowie der Konsequenzen einer Dysregulation in einem dieser Systeme liegen daher im Interesse zahlreicher Forschungsgruppen.

Unter dieser Prämisse sind auch die Arbeiten zahlreicher Autoren zu sehen, die seit Jahren mit Hilfe gegen den TNFR2-gerichteter Antikörper eine präzisere und differenziertere Charakterisierung des Rezeptors erzielen wollten (Espevik et al., 1990; Grell et al., 1995; Shalaby et al., 1990; Sheehan et al., 1995).

Für die Entwicklung eines geeigneten Mausmodells, mit dem auch in vivo eine genauere Untersuchung der mTNFR2-vermittelten Signalwege erfolgen kann, ist es notwendig einen in der Maus hergestellten, monoklonalen Antikörper zur Verfügung zu haben, der durch ein gezieltes Rezeptortargeting Aufschluss über die Rezeptorfunktion gibt.

Die hohe Bindungsspezifität des hergestellten monoklonalen Antikörpers DJ2008 im ELISA, im Dot Blot und im Western Blot-Verfahren machen ihn zwar zu einem wertvollen analytischen Werkzeug mit dem zum Beispiel im Rahmen von Gewebe- und Flüssigkeitsanalysen eine Rezeptordetektion möglich wäre, mangels agonistischer oder antagonistischer Funktion ist er allerdings weniger für funktionelle in vivo Tests geeignet. Da wie bereits einleitend erwähnt, bekannt ist, dass bei zahlreichen entzündlichen, autoimmunologischen, sowie malignen Erkrankungen der Serumspiegel an TNF-Rezeptoren erhöht ist (Aderka et al., 1991; Aderka et al., 1993; Cope et al., 1992; Gattorno et al., 1996),



könnte die Bestimmung der freien Rezeptormenge von diagnostischer Relevanz sein. Obwohl diese noch keinen Platz in der klinischen Routinediagnostik gefunden hat, wäre dies ein neuer Ansatzpunkt, mit dem genauere Informationen über das Stadium, den Fortschritt und die Prognose der zu Grunde liegenden Krankheit erlangt werden könnten. Vorstellbar wäre ein mit Hilfe des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak entwickeltes Testverfahren zur Bestimmung der freien Rezeptormenge in verschiedenen Körperflüssigkeiten, wie z.B. Serum oder Urin. Damit würden weitere Erkenntnisse über die diagnostische und therapeutische Relevanz der TNF-Rezeptoren erlangt werden.

Eine mögliche Versuchsanordnung wäre zum Beispiel das ELISA-Sandwich-Verfahren, bei dem der monoklonale Antikörper als sogenannter „*Capture antibody*“ an die Mikrotiterplatte gebunden würde und den Rezeptor aus der Probeflüssigkeit separieren könnte. Somit wäre in Zukunft die Untersuchung von wässrigen Proben auf die Rezeptorkonzentration hin ohne aufwändige Probenvorbereitung schnell und kostengünstig durchführbar.

Auch die Kopplung an verschiedene Festphasen-Matrices wäre ein denkbare Einsatzgebiet des monoklonalen Antikörpers. In Form von feinen Kugeln, den sogenannten *Beads*, die aus verschiedensten Materialien wie Polystyren (Liddell und Weeks, 1995) oder Alginat-Chitosan-Gel (Albarghouthi et al., 2000) bestehen, machen einen noch vielfältigeren Einsatz monoklonaler Antikörper möglich.

Eine interessante Möglichkeit bieten in diesem Zusammenhang z. B. paramagnetische *Beads*. Diese, an Antikörper gebundene Micron-Partikel ermöglichen durch ihren störenden Einfluss auf ein Magnetfeld eine physikalische Detektion in der Probe ohne Störung durch die Matrix (Richardson et al., 2001). Antikörper-beladene Partikel ermöglichen damit die Sammlung und Isolierung von Molekülen aus einer wässrigen Lösung heraus. Immunoaffinitäts-Säulen, die mit diesen Partikeln gefüllt sind, können der Ausfilterung unerwünschter Antigene ebenso dienen, wie der Aufkonzentrierung der Zielstruktur. Die gebundenen Moleküle können in einem zweiten Schritt von der Matrix gelöst und anderen analytischen Verfahren wie z. B. der Massenspektrometrie zugänglich gemacht werden. Durch das Versetzen der Probe mit den Antikörper-gekoppelten *Beads* und das Einbringen in ein starkes Magnetfeld werden die *Beads* festgehalten, während der Rest der Probe entfernt oder abgesaugt werden kann. Nach Entfernen des Magnetfelds werden die Partikel dann resuspendiert.

Auch eine Anwendung des monoklonalen Antikörpers in weiteren Immunoassays, wie etwa der Immunhistochemie ist nach der Kopplung eines fluoreszierenden Farbstoffes an den Antikörper durchaus denkbar. Im Falle einer Detektion des Zielantigens durch den Antikörper würde der fluorochrome Farbstoff am Ort der immunchemischen Reaktion im

Fluoreszenzmikroskop sichtbar werden (Harlow, 1988). Diese Visualisierung der Antigen-Antikörperreaktion könnte im Rahmen immunhistologischer Untersuchungen einer genaueren Erforschung der Rezeptorlokalisierung in den untersuchten Gewebeproben und so weiteren Forschungszwecke dienen.

#### **4.9 Der TNFR2 als therapeutische Zielstruktur in der Medizin**

Da TNF eines der wichtigsten Zytokine im Organismus ist und als solches zahlreiche immunologische Vorgänge im Körper steuert, ergeben sich mit der Dysregulation im TNF-System zahlreiche akute und chronische Krankheitsbilder. Während die Applikation von TNF in der Klinik nur ein äußerst begrenztes Anwendungsgebiet hat, nimmt die anti-Zytokin-Therapie in der Behandlung einer zunehmenden Anzahl von Krankheiten einen immer größeren Stellenwert ein (Kap. 1.2.2).

Da TNF viele verschiedene physiologische Funktionen der Immunabwehr reguliert, ergibt sich mit einer TNF-Blockade eines der Hauptprobleme der anti-TNF-Therapie, nämlich die zahlreichen und zum Teil sehr schweren Nebenwirkungen für den Patienten. Zu diesen mit der  $\alpha$ -TNF-Therapie einhergehenden Begleiterscheinungen gehören vor allem das Auftreten zahlreicher bakterieller und viraler Infektionen, sowie Pilzinfektionen (Keystone, 2005; Salliot et al., 2007). Außerdem kann es im Rahmen einer anti-Zytokin-Therapie zu Reaktivierungen latenter Tuberkuloseinfektion kommen (Gardam et al., 2003; Long und Gardam, 2003; Oluwabunmi et al., 2006). Zur Vermeidung dieser Komplikationen und zur spezifischen Modulation immunologischer Vorgänge wäre ein gezieltes Targeting des Krankheits-verursachenden Rezeptors unter Beibehaltung der protektiven TNF-Funktionen von großem Interesse (Curtis et al., 2007; Dixon et al., 2006).

Auch für die Weiterentwicklung bereits erhältlicher anti-TNF-Therapeutika ist eine rezeptor-selektive, genauere Erforschung der zugrunde liegenden Mechanismen von großer Bedeutung um die auftretenden Nebenwirkungen für den Patienten zu minimieren. Ein gezielter Eingriff in das für die Krankheit verantwortliche System ist daher Gegenstand der derzeitigen Entwicklung TNF-Rezeptor-selektiver Medikamente (Kollias, 2002).

Inzwischen konnte vor allem die besondere Relevanz des TNFR2 für die Entstehung zahlreicher Erkrankungen bewiesen werden (Douni und Kollias, 1998). So zeigte sich, dass der TNFR2 auf den Zellen einer gesunden Niere kaum exprimiert ist, während er im Falle einer akuten Abstoßungsreaktion von Nierentransplantaten auf nahezu allen Zellen des Nierengewebes hochreguliert ist (Al-Lamki et al., 2001). Auch histologische Untersuchungen der Biopsien abgestoßener Nierentransplantate zeigten eine signifikant erhöhte Expression

des TNFR2 im Nierengewebe. Im Tiermodell konnte diese Beobachtung unter standardisierten Bedingungen sowohl für die akute, als auch für die chronische Abstoßungsreaktion von Nierentransplantaten nachvollzogen werden (Hoffmann et al., 2009). Auch bei der Graft-versus-host-disease, einer lebensbedrohliche Komplikation nach Knochenmarks- oder Stammzelltransplantationen, bei der vor allem die im Transplantat enthaltenen T-Lymphozyten des Spenders den Empfängerorganismus angreifen, konnte eine maßgebliche Beteiligung von TNFR2-vermittelten immunologischen Vorgängen gezeigt werden (Brown et al., 2002).

Eine weitere pathophysiologisch bedeutsame Rolle besitzt der TNFR2 in der Entstehung der Glomerulonephritis, die als Autoimmunerkrankung eine der häufigsten Ursachen des akuten Nierenversagens beim Menschen ist. Unter experimentellen Bedingungen konnte belegt werden, dass der TNFR2 auf den Nierenendothelien während einer Entzündung vermehrt exprimiert ist und die darüber vermittelten Signalkaskaden ursächlich für die Entwicklung dieses Krankheitsbildes sind. Dagegen waren die TNFR2<sup>-/-</sup> Mäuse vollständig vor der Entstehung der Glomerulonephritis geschützt (Vielhauer, 2005).

Auch bei anderen Autoimmunerkrankungen, wie etwa dem Morbus Crohn wurde die vermehrte TNFR2-Expression auf den Zellen der Darmschleimhaut, sowie den T-Lymphozyten im Blut der Patienten nachgewiesen (Holtmann et al., 2002a; Mizoguchi et al., 2002). Im Mausmodell mit einer transgenen Zelllinie, die den TNFR2 überexprimierte wurde diese maßgebliche Beteiligung des TNFR2 in der Entstehung inflammatorischen Darmerkrankungen bestätigt (Holtmann et al., 2002b).

Aufgrund der Tatsache, dass eine Beteiligung des TNFR2 bei einer Reihe weiterer entzündlicher und autoimmunologischer Krankheiten wie etwa der Sepsis (Schröder et al. 1995), der chronischen Hepatitis (Marinos et al. 1995), dem idiopathischen Pneumonie-Syndrom nach Stammzelltransplantation (Hildebrandt et al., 2008), oder der zerebralen Malaria (Lucas et al., 1997) nachgewiesen wurde, bietet sich mit diesem Rezeptor als Zielstruktur ein neuartiger Ansatzpunkt in der immunologischen Therapie. Auch bei der akuten Pankreatitis (Beaux et al., 1996), dem Lupus erythematoses (Aderka et al., 1993; Gabay et al., 1997) und der Rheumatoiden Arthritis (Cope et al., 1992) ist der TNFR2 maßgeblich beteiligt und damit eine potentielle und vielversprechende Zielstruktur in der Erforschung und Entwicklung neuer therapeutischer Strategien.

## 5 Zusammenfassung

TNF ist ein Zytokin, das sowohl in der lokalen, als auch in der systemischen Entzündungsreaktionen eine ganz zentrale Rolle einnimmt. Es wurde als Mediator zahlreicher inflammatorischer und immunologischer Krankheitsbilder identifiziert und gilt auch in der Infektionsabwehr als einer der wichtigsten Regulatoren der Immunaktivität.

Die Entwicklung neuer Therapiestrategien in der Medizin schreitet in den letzten Jahrzehnten rasant voran. Es zeigte sich dabei zunehmend, dass das Immunsystem eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von Erkrankungen spielt und es daher vor allem im Bereich der Immunregulation weiteren Forschungs- und Entwicklungsbedarf gibt.

Besondere Bedeutung kommt dabei dem immunregulatorischen TNF zu, das als pleiotrop wirkendes Zytokin zahlreiche biologische Funktionen steuert. Die Effekte werden über die Aktivierung zweier membranständiger Rezeptoren, den TNFR1 und den TNFR2 vermittelt. Da eine Dysregulation im TNF-System zu einer Vielzahl entzündlicher und autoimmunologisch- bedingter Krankheiten führen kann und dabei vor allem auch dem TNFR2 eine wichtige pathophysiologische Bedeutung nachgewiesen werden konnte, ist die genaue Erforschung der über diesen Rezeptor vermittelten Signalkaskaden von großem Interesse. Auch im Hinblick auf die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien wäre ein gegen den Maus-TNFR2 gerichteter Antikörper mit agonistischen oder antagonistischer Funktion ein geeignetes molekulares Werkzeug, um die Funktion dieses Rezeptors auch in vivo grundlegend zu erforschen.

Da es derzeit keinen monoklonalen „Maus-anti-Maus“ Antikörper gegen den mTNFR2 gibt war es Ziel dieser Arbeit, in der Maus einen spezifischen Antikörper gegen den mTNFR2 zu entwickeln und seine funktionellen Eigenschaften weiter zu charakterisieren.

Durch die Immunisierung von mTNFR2<sup>-/-</sup> Mäusen gelang es, mittels Hybridomatechnik den stabil wachsenden Zellklon DJ2008 zu etablieren, der monoklonale Antikörper gegen den mTNFR2 der Subklasse IgG<sub>1</sub>-κ synthetisierte.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass der monoklonale Antikörper im ELISA-, im Dot Blot- und im Western Blot-Verfahren zur Detektion des rekombinant hergestellten mTNFR2-Proteins geeignet war.

Eine Bindung des monoklonalen Antikörpers an den zellständigen mTNFR2 transformierter CHO-Zellen konnte durchflusszytometrisch nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Die Bindungsfähigkeit des Antikörpers an den nativen mTNFR2 der T-Zellen aus Milz und Thymus der Maus konnte aufgrund unspezifischer Reaktionen des Sekundärantikörpers mit

den stimulierten Mauszellen nicht hinreichend geklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der monoklonale m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak keine kreuzreaktiven Eigenschaften gegenüber den mTNFR1 besaß.

Funktionell zeigte der Antikörper keine aktivierenden Eigenschaften auf die TNFR2-induzierte Proliferationsrate cytotoxischer T-Zellen. Des Weiteren wurden in den durchgeführten Bioassays keine blockierenden Eigenschaften auf den zellständigen mTNFR2 der CT-6 Zelllinie und den löslichen rekombinanten mTNFR2 nachgewiesen.

Insgesamt gelang es in dieser Arbeit erstmals einen monoklonalen Antikörper mit spezifischen Bindungseigenschaften für den mTNFR2 in der Maus herzustellen. Aufgrund seiner Einsetzbarkeit in verschiedenen analytischen Verfahren wie dem ELISA, Dot-Blot und Western Blot, könnte er als molekulares Werkzeug für zahlreiche weiterführende Untersuchungen und Forschungszwecke eingesetzt werden.

Im Hinblick auf seine funktionellen Eigenschaften für den mTNFR2 sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um die molekularen Effekte des Antikörpers auf seinen Zielrezeptor genauer zu charakterisieren.

## 6 Literturverzeichnis

**Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S.** (2007): Cellular and Molecular Immunology. *Elsevier Saunders*

**Aderka, D.** (1996): The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **3**, 231–240.

**Aderka, D., Engelmann, H., Hornik, V., Skornick, Y., Levo, Y., Wallach, D., Kushtai, G.** (1991): Increased Serum Levels of Soluble Receptors for Tumor Necrosis Factor in Cancer Patients. *Cancer Research.* **51**, 5602-5607.

**Aderka, D., Engelmann, H., Shemer-Avni, Y., Hornik, V., Galil, A., Sarov, B., Wallach, D.** (1992): Variation in serum levels of the soluble TNF receptors among healthy individuals. *Lymphokine Cytokine Res.* **11**, 157-159.

**Aderka, D., Sorkine, P., Abu-Abid, S., Lev, D., Setton, A., Cope, A. P., Wallach, D. Klausner, J.** (1998): Shedding kinetics of soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors after systemic TNF leaking during isolated limb perfusion. Relevance to the pathophysiology of septic shock. *J. Clin. Inves.*, **3**, 650–659.

**Aderka, D., Wysenbeek, A., Engelmann, H., Cope, A. P., Brennan, F., Molad, Y., Hornik, V., Levo, Y., Maini, R. N., Feldmann, M.** (1993): Correlation between serum levels of soluble tumor necrosis factor receptor and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism.* **36**, 1111-1120.

**Aggarwal, B.** (2003): Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 745-756.

**Aggarwal, B. B., Kohr, W. J., Hass, P. E., Moffat, B., Spencer, S. A., Henzel, W. J., Bringman, T. S., Nedwin, G. E., Goeddel, D. V., Harkins, R. N.** (1985): Human tumor necrosis factor. Production, purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **260**, 2345-2354.

**Aggarwal, B. B., Shishodia, S., Ashikawa, K., Bharti, A. C.** (2002): The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* **1**, 327-341.

**Albarghouthi, M., Fara, D. A., Saleem, M., El-Thaher, T., Matalka, K., Badwan, A.** (2000): Immobilization of antibodies on alginate-chitosan beads. *Int J Pharm.* **206**, 23-34.

- Albrecht, H., Radosevich, J., Babich, M.** (2009): Fundamentals of antibody-related therapy and diagnostics. *Drugs Today*. **3**, 199–211.
- Al-Lamki, R. S., Wang J., Skepper, J. N., Thiru, S., Pober, J. S., Bradley, J. R.** (2001): Expression of tumor necrosis factor receptors in normal kidney and rejecting renal transplants. *Lab Invest*. **81**, 1503-1515.
- Ameloot, P., Fiers, W., Bleser, P., Ware, C. F., Vandenabeele, P., Brouckaert, P.** (2001): Identification of tumor necrosis factor (TNF) amino acids crucial for binding to the murine p75 TNF receptor and construction of receptor-selective mutants. *The Journal of biological chemistry*. **276**, 37426-37430.
- Annunziato, F., Cosmi L., Liotta, F., Lazzeri E., Manetti, R., Vanini, V., Romagnani, P., Maggi, E., Sergio, R.** (2002): Phenotype, Localization, and Mechanism of Suppression of CD4+CD25+ Human Thymocytes. *The Journal of Experimental Medicine*. **196**, 379-387.
- Aspalter, M. R., Eibl, M. M., Wolf, M. H.** (2003): Regulation of TCR-mediated T cell activation by TNF-RII. *Journal of Leukocyte Biology*. **74**, 572-582.
- Baert, F., Noman, M., Vermeire, S., Assche, G., Haens, G., Carbonez, A., Rutgeerts, P.** (2003): Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med*. **348**, 601-608.
- Baker, S. J., Reddy, E. P.** (1998): Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene*. **17**, 3261-3270.
- Beaux, A. C., Goldie, A. S., Ross, J. A., Carter, D. C., Fearon, K. C.** (1996): Serum concentrations of inflammatory mediators related to organ failure in patients with acute pancreatitis. *Br J Surg*. **83**, 349-53.
- Berg, P. A.** (2004): Risks and side effect reactions during therapy with TNF-alpha blockers. An immunologic analysis. *Dtsch. Med Wochenschr*. **129**, 1631-1634.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L.** (2003): Biochemie. *Spektrum. Akademischer Verlag*
- Beutler, B., Cerami, A.** (1985): Cachectin/tumor necrosis factor: an endogenous mediator of shock and inflammation. *Immunol Res*. **5**, 281-293.
- Bisikirska, B., Colgan, J., Luban, J., Bluestone, J. A., Herold, K. C.** (2005): TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8+ T cell population and induces CD8+CD25+ Tregs. *J. Clin. Invest*. **115**, 2904-2913.

- Boyce, E.G., Halilovic, J., Stan-Ugbene, O.** (2010): Golimumab: Review of the efficacy and tolerability of a recent approved tumor necrosis factor- $\alpha$ -inhibitor. *Clinical Therapeutics*. 32(10), 1681-703.
- Brekke, O. H., Sandlie, I.** (2003): Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2, 52-62.
- Brockhaus, M., Schoenfeld, H. J., Schlaeger, E. J., Hunziker, W., Lesslauer, W., Loetscher, H.** (1990): Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 87, 3127-3131.
- Brown, R., Lee, E., Thiele, D. L.** (2002): TNF-TNFR2 Interactions Are Critical for the Development of Intestinal Graft-Versus-Host Disease in MHC Class II-Disparate (C57BL/6J- $\times$ C57BL/6J x bm12)F1 Mice. *The Journal of Immunology*. 168, 3065-3071.
- Bryde, S., Grunwald, I., Hammer, A., Krippner-Heidenreich, A., Schiestel, T., Brunner, H., Tovar, G., Pfizenmaier, K., Scheurich, P.** (2005): Tumor necrosis factor (TNF)-functionalized nanostructured particles for the stimulation of membrane TNF-specific cell responses. *Bioconjug Chem.* 16, 1459-1467.
- Butty, V. L., Roux-Lombard, P., Garbino, J., Dayer, J. M., Ricou, B.** (2003): Anti-inflammatory response after infusion of p55 soluble tumor necrosis factor receptor fusion protein for severe sepsis. *Eur Cytokine Netw.* 14, 15-19.
- Campbell, A. M.** (1984): Monoclonal antibody technology. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. *Elsevier*
- Caponi, L. (Hg.)** (1999): Antibody usage in the lab. *Springer*
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., Williamson B.** (1975): An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 72, 3666-3670.
- Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Bui, K. L., Lenardo, M. J.** (2000): A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*. 288, 2328-2329.
- Charles, P., Elliott, M. J., Davis, D., Potter, A., Kalden, J. R., Antoni, C., Breedveld, F. C., Smolen, J. S., Eberl, G., de Woody, K.** (1999): Regulation of cytokines, cytokine inhibitors, and acute-phase proteins following anti-TNF- $\alpha$  therapy in rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 163, 1521-1528.



- Chen, X., Bäuml, M., Männel N. D., Howard, O. M., Oppenheim, J.** (2007): Interaction of TNF with TNF Receptor Type 2 Promotes Expansion and Function of Mouse CD4+CD25+ T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology*. **179**, 154.
- Clark, M. R.** (1997): IgG effector mechanisms. *Chem. Immunol.* **65**, 88-110
- Coligan, J. E.** (1991): Current protocols in immunology. *Wiley*
- Cope, A. P., Aderka, D., Doherty, M., Engelmann, H., Gibbons, D., Jones, A. C., Brennan, F. M., Maini. R. N., Wallach, D., Feldmann, M.** (1992): Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the sera and synovial fluid of patients with rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* **35**, 1160-1169.
- Croft, M.** (2003): Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat. Rev. Immunol.*, **8**, 609–620.
- Cruse, J. M., Lewis, R. E.** (2006): Historical atlas of immunology. *Taylor & Francis*.
- Curtis, J. R., Patkar, N., Xie, A., Martin, C., Allison, J. J., Saag, M., Shatin, D., Saag, K. G.** (2007): Risk of serious bacterial infections among rheumatoid arthritis patients exposed to tumor necrosis factor alpha antagonists. *Arthritis Rheum.* **56**, 1125-1133.
- Darzynkiewicz, Z., Robinson, J.** (2001): Cytometry. Methods in cell biology. *Acad. Press, San Diego*
- Dembic, Z., Loetscher, H., Gubler, U., Pan, Y. C., Lahm, H. W., Gentz, R., Brockhaus, M., Lesslauer, W.** (1990): Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequences. *Cytokine*. **2**, 231-237.
- Deventer, S.** (1999): Anti-TNF antibody treatment of Crohn's disease. *Ann Rheum Dis.* **58**, 114–120.
- Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M., Liu, Z.** (2000): The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity*. **12**, 419-429.
- Diez-Ruiz, A., Tilz, G. P., Zangerle, R., Baier-Bitterlich, G., Wachter, H., Fuchs, D.** (1995): Soluble receptors for tumour necrosis factor in clinical laboratory diagnosis. *Eur J Haematol.* **54**, 1-8.
- Dixon, W. G., Watson, K., Lunt, M., Hyrich, K. L., Silman, A. J., Symmons, D. P.** (2006): Rates of serious infection, including site-specific and bacterial intracellular infection, in

rheumatoid arthritis patients receiving anti-tumor necrosis factor therapy: results from British Society for Rheumatology Biologics Register. *Arthritis Rheum.* **54**, 2368-2376

**Doellnerab, H., Arntzenb, K. J., Haereida, P., Aaga, S., Brubakka, A., Austgulenb, R.** (1998): Increased serum concentrations of soluble tumor necrosis factor receptors p55 and p75 in early onset neonatal sepsis. *Early Human Development.* **52**, 251-261.

**Douni, E., Kollias, G.** (1998): A critical role of the p75 tumor necrosis factor receptor (p75TNF-R) in organ inflammation independent of TNF, lymphotoxin alpha, or the p55TNF-R. *J Exp Med.* **188**, 1343-1352.

**Efimov, G. A., Kruglov, A. A., Tillib, S. V., Kuprash, D. V., Nedospasov, S. A.** (2009): Tumor Necrosis Factor and the consequences of its ablation in vivo. *Mol. Immunol.*, **47**, 19–27.

**Eggermont, A., Hagen, T.** (2001): Isolated limb perfusion for extremity soft-tissue sarcomas, in-transit metastases and other unresectable tumors: Credits debits and future perspectives. *Current Oncology Reports* **4**, 359-367.

**Eggermont, A. M., Schraffordt Koops, H., Klausner, J. M., Liénard, D., Kroon, B. B., Schlag, P. M., Ben-Ari, G., Lejeune, F. J.** (1997): Isolation limb perfusion with tumor necrosis factor alpha and chemotherapy for advanced extremity soft tissue sarcomas. *Semin Oncol.* **24**, 547-555.

**Ehrlich, P.** (1901): Die Schutzstoffe des Blutes. *Deutsche medizinische Wochenschrift* **27**, 865-867, 888-891, 913-916

**Ehrlich, P., Morgenroth J.** (1904): Wirkung und Entstehung der aktiven Stoffe im Serum nach der Seitenkettentheorie. *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen.* **1**, 430-451.

**Elewaut, D., Matucci-Cerinic, M.** (2009): Treatment of ankylosing spondylitis and extra-articular manifestations in everyday rheumatology practice. *Rheumatology.* **48**, 1029-1035.

**Engelmann, H., Aderka, D., Rubinstein, M., Rotman, D., Wallach, D.** (1989): A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity. *J. Biol. Chem.* **264**, 11974-11980.

**Erickson, S. L., de Sauvage F.J., Kikly, K., Carver-Moore, K., Pitts-Meek, S., Gillett, N., Sheehan, K. C., Schreiber, R. D., Goeddel, D. V., Moore, M. W.** (1994): Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. *Nature.* **372**, 560 -563.

- Espevik, T., Brockhaus, M., Loetscher, H., Nonstad, U., Shalaby, R.** (1990): Characterization of binding and biological effects of monoclonal antibodies against a human tumor necrosis factor receptor. *Journal of Experimental Medicine*. **171**, 415-426.
- European Medicines agency** (2009)  
<http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Beromun/000299de1.pdf>.
- Fleischmann, R., Shealy, D.** (2003): Developing a New Generation of TNF-alpha-Antagonists for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Mol. Interv.* **3**, 310-318.
- Fleischmann, R., Vencovsky, J., Vollenhoven, R. F., Box, J., Coteur, G., Goel, N., Brezinschek, H. P., Innes, A., Strand, V.** (2009): Efficacy and safety of certolizumab pegol monotherapy every 4 weeks in patients with rheumatoid arthritis failing previous disease-modifying antirheumatic therapy: the FAST4WARD study. *Ann Rheum Dis*. **68**, 805-811.
- Fromont, A., Seze, J., Fleury, M. C., Maillefert, J. F., Moreau, T.** (2009): Inflammatory demyelinating events following treatment with anti-tumor necrosis factor. *Cytokine*. **45**, 55-57.
- Gabay, C., Cakir, N., Moral, F., Roux-Lombard, P., Meyer, O., Dayer, J. M., Vischer, T., Yazici, H., Guerne, P. A.** (1997): Circulating levels of tumor necrosis factor soluble receptors in systemic lupus erythematosus are significantly higher than in other rheumatic diseases and correlate with disease activity. *J Rheumatol*. **24**, 303-8.
- Ganten, D.; Ruckpaul, K. (Hg.)** (2008): Grundlagen der Molekularen Medizin. *Springer*
- Gardam, M. A., Keystone, E. C., Menzies, R., Manners, S., Skamene, E., Long, R., Vinh, D.** (2003): Anti-tumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and clinical management. *The Lancet Infectious Diseases*. **3**, 148 -155.
- Gatanaga, T., Hwang, C. D., Kohr, W., Cappuccini, F., Lucci, J. A., Jeffes, E. W., Lentz, R., Tomich, J., Yamamoto, R. S., Granger, G. A.** (1990): Purification and characterization of an inhibitor (soluble tumor necrosis factor receptor) for tumor necrosis factor and lymphotoxin obtained from the serum ultrafiltrates of human cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. **87**, 8781–8784.
- Gattorno, M., Picco, P., Buoncompagni, A., Stalla, F., Facchetti, P., Sormani, M. P., Pistoia, V.** (1996): Serum p55 and p75 tumour necrosis factor receptors as markers of disease activity in juvenile chronic arthritis. *Ann Rheum Dis*. **55**, 243–247.

- Godfried, M. H., Poll, T., Jansen, J., Romijin, J. A., Schattenkerk, J. K., Endert, E., Deventer, S. J., Sauerwein, H. P.** (1993): Soluble receptors for tumour necrosis factor: a putative marker of disease progression in HIV infection. *AIDS*. **7**, 33-36.
- Gómez-Reino, J. J., Carmona, L., Valverde, V. R., Mola, E. M., Montero, M. D.** (2003): Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to significant increase in tuberculosis risk: a multicenter active-surveillance report. *Arthritis Rheum.* **48**, 2122-2127.
- Grell, M., Becke, F. M., Wajant, H., Männel, D. N., Scheurich, P.** (1998a): TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1. *European journal of immunology*. **28**, 257-63.
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S. L., Kollias, G., Pfizenmaier, K., Scheurich, P.** (1995): The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor recepto. *Cell*. **83**,793-802.
- Grell, M., Scheurich, P., Meager, A., Pfizenmaier, K.** (1993): TR60 and TR80 tumor necrosis factor (TNF)-receptors can independently mediate cytolysis. *Lymphokine Cytokine Res.* **12**,143-148.
- Grell, M. W., Zimmermann, G., Scheurich, P.** (1998b): The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.* **95**, 570-575.
- Hainsworth, J. D., Litchy, S., Burris, H. A., Scullin, D. C., Corso, S. W., Yardley, D. A., Morrissey L., Greco, F. A.** (2002): Rituximab as first-line and maintenance therapy for patients with indolent non-hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* **20**, 4261-4267.
- Haridas, V., Darnay, B. G., Natarajan, K., Heller, R., Aggarwal, B. B.** (1998): Overexpression of the p80 TNF Receptor Leads to TNF-Dependent Apoptosis, Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation, and c-Jun Kinase Activation. *The Journal of Immunology*. **160**, 3152-3162.
- Harlow, E. L.** (1988): Antibodies. A laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*.
- Hehlgans, T., Männel, D. N.** (2002): The TNF- TNF-receptor system. *Biol Chem* **383**, 1581-1585

- Hehlgans, T., Pfeffer, K.** (2005): The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*. **115**, 1–20.
- Heim, M. E., Siegmund, R., Illiger, H. J., Klee, M., Rieche, K., Berdel, W. E., Edler, L.** (1990): Tumor necrosis factor in advanced colorectal cancer: a phase II study. A trial of the phase I/II study group of the Association for Medical Oncology of the German Cancer Society. *Onkologie*. **13**, 444-447.
- Hermanson, G. T.** (2007): Bioconjugate techniques. *Acad. Press, San Diego*.
- Hildebrandt, G. C., Olkiewicz, K. M., Corrion, L., Clouthier, S. G., Pierce, E., Liu, C., Cooke, K. R.** (2008): A Role for TNF receptor type II in Leukocyte Infiltration into the Lung during Experimental Idiopathic Pneumonia Syndrome. *Biol Blood Marrow Transplant*. **14**, 385-396.
- Hoffmann, U., Bergler, T., Rihm, M., Pace, C., Krüger, B., Rümmele, P., Stoelcker, B., Banas, B., Männel, D. N., Krämer, B. K.** (2009): Upregulation of TNF receptor type 2 in human and experimental renal allograft rejection. *Am J Transplant*. **9**, 675-686.
- Holländer, G. A., Barthlott, T. (Hg.)** (2006): Immunologie. *Elsevier*.
- Holtmann, M. H., Douni, E., Schütz, M., Zeller, G., Mudter, J., Lehr, H. A., Gerspach, J., Scheurich, P., Galle, P. R., Kollias, G., Neurath, M. F.** (2002a): Tumor necrosis factor-receptor 2 is up-regulated on lamina propria T-cells in Crohn's disease and promotes experimental colitis in vivo. *Eur J Immunol*. **32**, 3142-3151.
- Holtmann, M. H., Schuchmann, M., Zeller, G., Galle, P. R., Neurath, M. F.** (2002b): The emerging distinct role of TNF-receptor 2 (p80) signaling in chronic inflammatory disorders. *Arch Immunol Ther Exp*. **50**, 279-288.
- Idriss, H. T., Naismith, J.** (2000): TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*. **50**, 184-195.
- Institute for Laboratory Animal Research** (1999): Monoclonal Antibody Production. Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies. *National Academy Press*.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.** (2007): Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag*.
- Johnson, M.** (2002): Muromonab-CD3. *Gale Encyclopedia of Cancer. Encyclopedia.com*.

- Kelliher, M. A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B. Z., Leder, P.** (1998): The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity*. **8**, 297-303.
- Keystone, E.** (2005): Safety of biological therapies-an update. *J Rheumatol*. **74**, 8-12
- Keystone, E., Heijde, D., Mason, D., Landewé, R., Vollenhoven, R. V., Combe, B., Emery, P., Strand, V., Mease, P., Desai, C., Pavelka, K.** (2008): Certolizumab pegol plus methotrexate is significantly more effective than placebo plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: findings of a fifty-two-week, phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Arthritis Rheum*. **58**,319-329.
- Kim, Y. E., Priatel, J. J., Teh, S.-J., Teh, H.-S.** (2006): TNF Receptor Type 2 (p75) Functions as a Costimulator for Antigen-Driven T Cell Responses In Vivo. *Journal of Immunology*. **176**, 1026-1035.
- Kim, E. Y., Teh, H. S.** (2001): TNF type 2 receptor (p75) lowers the threshold of T cell activation. *J Immunol*. **167**. 6812-6820.
- Kim, E. Y., Teh, H. S.** (2004): Critical role of TNF receptor type-2 (p75) as a costimulator for IL-2 induction and T cell survival: a functional link to CD28. *J Immunol*. **173**, 4500-4509.
- Köhler, G., Milstein, C.** (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495–497.
- Kollias, G. K.** (2002): Role of TNF/TNFR in autoimmunity: specific TNF receptor blockade may be advantageous to anti-TNF treatments. *Cytokine Growth Factor Rev*. **13**, 315-321.
- Krippner-Heidenreich, A., Grunwald, I., Zimmermann, G., Kühnle, M., Gerspach, J., Sterns, T., Shnyder, S. D., Gill, J. H., Männel, D. N., Pfizenmaier, K., Scheurich, P.** (2008): Single-chain TNF, a TNF derivative with enhanced stability and antitumoral activity. *J Immunol*. **180**, 8176-8183.
- Krippner-Heidenreich A., Tübing, F., Bryde, S., Willi, S., Zimmermann, G., Scheurich, P.** (2002): Control of Receptor-induced Signaling Complex Formation by the Kinetics of Ligand/Receptor Interaction. *Journal of Biological Chemistry*. **277**, 44155-44163.
- Kruglov, A. A., Kuchmiy, A., Grivennikov, S., Tumanov, A. V., Kuprash, D. V., Nedospasov, S. A.** (2008): Physiological functions of tumor necrosis factor and the consequences of its pathologic overexpression or blockade: Mouse models. *Cytokine and Growth factor reviews*. **19**, 231-244.

- Kwon, B., Kim, B.-S., Cho, H. R., Park, J.-E.** (2003): Involvement of tumor necrosis factor receptor superfamily (TNFRSF) members in the pathogenesis of inflammatory diseases. *Exp. Mol. Med.*, **1**, 8–16.
- Lee, H.-H., Song, I.-H., Friedrich, M., Gauliard, A., Detert, J., Röwert, J., Audring, H., Kary, S., Burmester, G.-R., Sterry, W., Worm, M.** (2007): Cutaneous side-effects in patients with rheumatic diseases during application of tumour necrosis factor-alpha antagonists. *Br. J. Dermatol*, **3**, 486–491.
- Lejeune, F. J., Pujol, N., Liénard, D., Mosimann, F., Raffoul, W., Genton, A., Guillou, L., Landry, M., Chassot, P. -G., Chiolero, R., Bischof-Delaloye, A., Leyvraz, S., Mirimanoff, R.-O., Bejkos, D., Leyvraz, P.-F.** (2000): Limb salvage by neoadjuvant isolated perfusion with TNF $\alpha$  and melphalan for non-resectable soft tissue sarcoma of the extremities. *European Journal of surgical oncology*. **26**, 669-678.
- Lejeune, F.J., Rüegg, C.** (2006): Recombinant human tumor necrosis factor: an efficient agent for cancer treatment. *Bull Cancer*. **93**, 10090-10100
- Lewis, M., Tartaglia, L. A., Bennett, G. L., Rice, G. C., Wong, G. H., Chen, E. Y., Goeddel, D. V.** (1991): Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc Natl Acad Sci USA*. **88**, 2830-2834.
- Liddell, E., Weeks, I.** (1995): Antibody technology. *Bios scientific publishers Oxford*.
- Locksley, R., Killeen, N., Lenardo, M.** (2001): The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology. *Cell* **104**, 487-501.
- Loetscher, H., Gentz, R., Zulauf, M., Lustig, A., Tabuchi, H., Schlaeger, E. J., Brockhaus, M., Gallati, H., Manneberg, M., Lesslauer, W.** (1991): Recombinant 55-kDa tumor necrosis factor TNF receptor Stoichiometry of binig to TNF alpha and TNF beta and inhibition of TNF activity. *J. Biol. Chem.* **266**, 18324-18329
- Long, R., Gardam, M. A.** (2003): Tumour necrosis factor-{alpha} inhibitors and the reactivation of latent tuberculosis infection. *Canadian Medical Association Journal*. **168**, 1153.
- Lucas, R., Juillard, P., Decoster, E., Redard, M., Burger, D., Donati, Y., Giroud, C., Monso-Hinard, C., Kesel, T., Buurman, W. A., Moore, M. W., Dayer, J.-M., Fiers, W., Bluethmann, H., Grau, G. E.** (1997): Crucial role of tumor necrosis factor (TNF) receptor 2

and membrane-bound TNF in experimental cerebral malaria. *European Journal of Immunology*. **27**,1719 -1725.

**Lucas, R., Lou, J., Morel, D. R., Ricou, B., Suter, P. M., Grau, G. E.** (1997): TNF receptors in the microvascular pathology of acute respiratory distress syndrome and cerebral malaria. *J Leukoc Biol*. **61**, 551-558.

**MacEwan, D. J.** (2002): TNF ligands and receptors-a matter of life and death. *British journal of pharmacology*. **135**, 855-875

**Männel, D. N., Echtenacher, B.** (2000): TNF in the inflammatory response. *Chem. Immunol*. **74**, 141–161.

**Marinos, G., Naoumov, N. V., Rossol, S., Torre, F., Wong, P. Y., Gallati, H., Portmann, B., Williams, R.** (1995): Tumor necrosis factor receptors in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*. **108**, 1453-1463.

**Mease, P. J., Goffe, B. S., Metz, J., Vander Stoep, A., Finck, B., Burge, D. J.** (2000): Etanercept in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a randomised trial. *Lancet*. **356**, 385-390.

**Mizoguchi, E., Mizoguchi, A., Takedatsu, H., Cario, E., Jong, Y. P., Ooi, C. J., Xavier, R. J., Terhorst, C., Podolsky, D. K., Bhan, A. K.** (2002): Role of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in colonic epithelial hyperplasia and chronic intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology*. **22**, 134-144.

**Moreland, L. W., Baumgartner, S. W., Schiff, M. H., Tindall, E. A., Fleischmann, R. M., Weaver, A. L., Ettlinger, R. E., Cohen, S., Koopmann, W. J., Mohler, K., Widmer, M. B., Bloch, C. M.** (1997): Treatment of Rheumatoid Arthritis with a Recombinant Human Tumor Necrosis Factor Receptor (p75)-Fc Fusion Protein. *N Engl J Med*. **37**, 141-147.

**Olsen, N. J., Stein, M. C.** (2004): New Drugs for Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med*. **350**, 2167–2179.

**Oluwabunmi, Y. S., Sofer, C., Stein, D. S., Schwander, S. K., Wallis, R. S.** (2006): Tumor-Necrosis-Factor Blockers: Differential Effects on Mycobacterial Immunity. *The Journal of Infectious Diseases*. **194**, 486–492.

**Paul Ehrlich Institut**

[http://www.pei.de/cln\\_180/nn\\_158996/DE/arzneimittel/immunglobuline/monoclonals/monoclonals-node.html?\\_\\_nnn=true](http://www.pei.de/cln_180/nn_158996/DE/arzneimittel/immunglobuline/monoclonals/monoclonals-node.html?__nnn=true)



- Peppel, K., Crawford, D., Beutler, B.** (1991): A tumor necrosis factor (TNF) receptor-IgG heavy chain chimeric protein as a bivalent antagonist of TNF activity. *Journal of Experimental Medicine*. **174**, 1483-1489.
- Peterson, N. C., Peavey, J. E.** (1998): Comparison of In Vitro Monoclonal Antibody Production Methods with an In Vivo Ascites Production Technique. *Contemp Top Lab Anim Sci*. **37**, 61-66.
- Pimentel-Muñoz, F. X., Seed, B.** (1999): Regulated commitment of TNF receptor signaling: a molecular switch for death or activation. *Immunity*. **11**, 783-793.
- Porter, R. R.** (1973): Structural studies of immunoglobulins. *Science*. **180**, 713-716.
- Ranzinger, J., Krippner-Heidenreich, A., Haraszti, T., Bock, E., Tepperink, J., Spatz, J., Scheurich P.** (2009): Nanoscale Arrangement of Apoptotic Ligands Reveals a Demand for a Minimal Lateral Distance for Efficient Death Receptor Activation. *Nano Lett. Article ASAP*. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl902429b>
- Rathjen, D. A., Geczy, C. L.** (1986): Conditioned medium from macrophage cell lines supports the single-cell growth of hybridomas. *Hybridoma*. **5**, 255-261.
- Reimund, J. M., Ratajczyk, J., Sola, B., Justum, A. M., Müller, C. D.** (2007): Anti-Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- $\alpha$ ) Treatment Strategies in Crohn's Disease. *Recent Patents of Inflammation & Allergy Drug Discovery*. **1**, 21-34.
- Richardson, P. H.** (2001): The use of coated paramagnetic particles as a physical label in a magneto-immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics* **16**, 989-993.
- Rothstein, D. M., Sayegh, M. H.** (2003): T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Immunol Rev*. **196**, 85-108.
- Rüegg, C., Hasmim, M., Lejeune, F. J., Alghisi, G. C.** (2006): Antiangiogenic peptides and proteins: from, experimental tools to clinical drugs. *Biochim Biophys Acta*. **1765**, 155-177.
- Salliot, C., Gossec, L., Ruyssen-Witrand, A., Luc, M., Duclos, G.** (2007): Infections during tumour necrosis factor- $\alpha$  blocker therapy for rheumatic diseases in daily practice: a systematic retrospective study of 709 patients. *Rheumatology*. **46**, 327-334.
- Sandborn, J. W., Feagan, G. B., Stoinov, S., Honiball, J. P., Rutgeerts, P., Mason, D., Bloomfield, R., Schreiber, S.** (2007): Certolizumab Pegol for the Treatment of Crohn's Disease. *N Engl J Med*. **357**, 228-238.

- Scallon, B., Cai, A., Solowski, N., Rosenberg, A., Song, X., Shealy, D., Wagner, C.** (2002): Binding and Functional Comparisons of Two Types of Tumor Necrosis Factor Antagonists *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **301**, 418.
- Scallon, B. J., Moore, M. A., Knight, D. M., Ghrayeb, J.** (1995): Chimeric anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF- $\alpha$  and activates immune effector functions. *Cytokine*. **7**, 251-259.
- Schiestel, T., Brunner, H., Tovar, G.** (2004): Controlled Surface Functionalization of Silica Nanospheres by Covalent Conjugation Reactions and Preparation of High Density Streptavidin Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. **4**, 504-511.
- Schreiber, S., Khaliq-Kareemi, M., Lawrance, I. C., Thomsen, O., Hanauer, S. B., McColm, J., Bloomfield, R., Sandborn, W. J.** (2007): Maintenance therapy with certolizumab pegol for Crohn's disease. *N Engl J Med*. **357**, 239-50.
- Schröder, J., Stüber, F., Gallati, H., Schade, F. U., Kremer, B.** (1995): Pattern of soluble TNF receptors I and II in sepsis. *Infection*. **23**, 143-148.
- Shalaby, A., Sundan, H., Loetscher, M., Brockhaus, W., Lesslauer, E. T.** (1990): Binding and regulation of cellular functions by monoclonal antibodies against human tumor necrosis factor receptors. *Journal of Experimental Medicine*. **172**, 1517-1520.
- Sheehan, K. C., Pinckard, J. K., Arthur, C. D., Dehner, L. P., Goeddel, D. V., Schreiber, R. D.** (1995): Monoclonal antibodies specific for murine p55 and p75 tumor necrosis factor receptors: identification of a novel in vivo role for p75. *Journal of Experimental Medicine*. **181**, 607-617.
- Slifman, N. R., Gershon, S. K., Lee, J. H., Edwards, E. T., Braun, M. M.** (2003): Listeria monocytogenes infection as a complication of treatment with tumor necrosis factor alpha-neutralizing agents. *Arthritis Rheum*. **48**, 319-324.
- Smolen, J. S., Landewé, R. B., Mease, P., Brzezicki, J., Mason, D., Luijckens, K., Vollenhoven, R. F., Kavanaugh, A., Schiff, M. H., Burmester, G. R., Strand, V., Vencovsky, J., van der Heijde, D.** (2009): Efficacy and safety of certolizumab pegol plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: the RAPID 2 study. A randomised controlled trial. *Ann Rheum Dis*. **68**, 797-804.
- Sugasawara, R. J., Cahoon, B. E., Karu, A. E.** (1985): The influence of murine macrophage-conditioned medium on cloning efficiency, antibody synthesis, and growth rate of hybridomas. *J Immunol Methods*. **79**, 263-275.

- Tartaglia, L. A., Goeddel, D. V., Reynolds, C., Figari, I. S., Weber, R. F., Fendly, B. M., Palladino, M. A.** (1993a): Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *The Journal of Immunology*. **151**, 4637-4641,
- Tartaglia, L. A., Pennica, D., Goeddel, D. V.** (1993b): Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J. Biol. Chem.* **268**, 18542-18548.
- Tartaglia, L. A., Weber, R. F., Figari, I. S., Reynolds, C., Palladino, M. A., Goeddel, D. V.** (1991): The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**, 9292-9296.
- Taylor, P. C., Paleolog, E., Chapman, P. T., Elliott, M. J., McCloskey, R., Feldmann, M., Maini, R. N.** (2000): Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **43**, 38-47.
- Verhoef, C., Wilt, J. H., Grünhagen, D. J., Geel, A. N., Hagen, T. L., Eggermont, A. M.** (2007): Isolated limb perfusion with melphalan and TNF-alpha in the treatment of extremity sarcoma. *Curr Treat Options Oncol.* **8**, 417-427.
- Vielhauer, V., Stavrakis, G., Mayadas, T. N.** (2005): Renal cell-expressed TNF receptor 2, not receptor 1, is essential for the development of glomerulonephritis. *The Journal of clinical invest.* **115**, 1199-1209.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich P.** (2003): Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and Differentiation* **10**, 45-65.
- Weinberg, J. M.; Buchholz, R. (Hg.)** (2006): TNF-alpha inhibitors. Milestones in drug therapy. *Birkhäuser*
- Wiedmann, M. W., Mössner, J., Baerwald, C., Pierer, M.** (2009): TNF alpha Inhibition as Treatment Modality for Certain Rheumatologic and Gastrointestinal Diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* **9**, 295-314.
- Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E., Hoogenboom, H. R.** (1994): Making Antibodies by Phage Display Technology. *Annual Review of Immunology.* **12**, 433-455.
- Xu, J. L., Davis, M. M.** (2000): Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity.* **13**, 37-45.

---

**Zangerle, R., Gallati, H., Sarcletti, M., Weiss, G., Denz, H., Wachter, H., Fuchs, D.**  
(1994): Increased Serum Concentrations of Soluble Tumor Necrosis Factor Receptors in HIV-Infected Individuals Are Associated with Immune Activation. *J Acquir Immune Defic Syndr.* **7**, 79-85.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines IgG-Moleküls.....	3
Abbildung 2: Aussehen und Wirkungsweise von Immunglobulinen.....	5
Abbildung 3: Überblick über die verschiedenen rekombinanten Antikörper. ....	7
Abbildung 4: Überblick über die Signalkaskaden des TNFR1 und TNFR2.....	12
Abbildung 5: Schematische Darstellung bisher erhältlicher TNF-Antagonisten.....	18
Abbildung 6: Schematische Darstellung und Molekulargewicht des zur Immunisierung verwendeten Proteins mTNFR2-(ECD)-V5-His.....	28
Abbildung 7: Schematische Darstellung und Molekulargewicht des zum Nachweis spezifischer Antikörper verwendeten Proteins mTNFR2-(ECD)-IgG-(Fc).....	29
Abbildung 8: Überblicksschema zur Herstellung monoklonaler Antikörper nach der Hybridomatechnik.....	33
Abbildung 9: Schematische Darstellung des ELISA-Verfahrens zum Nachweis von Maus- $\alpha$ -mTNFR2-Antikörpern.....	39
Abbildung 10: Schematische Darstellung zur Testung kreuzreaktiver Eigenschaften des m- $\alpha$ -mTNFR2-AK mit dem mTNFR1 der L-929 Zelllinie. ....	46
Abbildung 11: Schematische Darstellung zum Test blockierender Eigenschaften des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak auf den zugegebenen mTNFR2 im TNF-induzierten Zytotoxizitätstest mit L-929-Zellen. ....	47
Abbildung 12: Schematische Darstellung des Bioassays zur Testung blockierende Eigenschaften des m- $\alpha$ -mTNFR2 auf den zellständigen mTNFR2. ....	49
Abbildung 13: Schematische Darstellung des Bioassays zur Testung aktivierender Eigenschaften des m- $\alpha$ -mTNFR2 auf den zellständigen mTNFR2. ....	50
Abbildung 14: Nachweis der m- $\alpha$ -mTNFR2-Antikörper im Serum der immunisierten Mäuse .....	55
Abbildung 15: Testung der Hybridomaüberstände auf eine Antikörperbindung an das mTNFR2-V5-His-Protein bzw. das mTNFR2-IgG-Protein im ELISA. ....	57
Abbildung 16: Isotypbestimmung des monoklonalen Antikörpers DJ2008.....	59
Abbildung 17: Detektion von mTNFR2-IgG durch Antikörper-enthaltende Hybridomaüberstände im Dot Blot. ....	60
Abbildung 18: Detektion der mTNFR2-Proteine durch den m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak im Western Blot-Verfahren. ....	61
Abbildung 19: Nachweis des rekombinanten mTNFR2-IgG-Protein im Western Blot-Verfahren.....	62

---

Abbildung 20:Nachweis des rekombinanten mTNFR2-V5-His-Protein im Western Blot-Verfahren.....	63
Abbildung 21:Über den mTNFR1-vermittelte Apoptoserate der L-929-Zellen in Anwesenheit von hTNF und mTNF.....	64
Abbildung 22:Kreuzreaktivitätstest des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak mit dem mTNFR1. ....	65
Abbildung 23: mTNF-induzierte Apoptoserate der L-929-Zellen in Anwesenheit löslicher mTNFR2-Proteine.....	66
Abbildung 24:Test hemmender Eigenschaften des Antikörpers auf den löslichen mTNFR2-IgG.....	67
Abbildung 25:mTNF-abhängige Proliferation der CT-6-Zellen.....	68
Abbildung 26:Lebendzellgate der CHO-Zellen. ....	70
Abbildung 27:Durchflusszytometrische Analyse des Anteils an mTNFR2 auf CHO wt-Zellen und CHO tg-Zellen.....	71
Abbildung 28:Durchflusszytometrische Analyse der Bindung des m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak an die Zellen.....	71
Abbildung 29:Durchflusszytometrische Färbung der Thymozyten zum Nachweis einer m- $\alpha$ -mTNFR2-Ak-Bindung an den mTNFR2 der T-Zellen. ....	73
Abbildung 30:Antikörper-Labeling mit Fluorochrom-markierten Fab-Fragmenten. ....	81

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick über die fünf Immunglobulinklassen .....	2
Tabelle 2: Liste derzeit erhältlicher TNFR2-Antikörper.....	20
Tabelle 3: Übersicht Geräte.....	21
Tabelle 4: Übersicht Verbrauchsmaterialien .....	22
Tabelle 5: Übersicht Chemikalien und Reagenzien .....	23
Tabelle 6: Übersicht Lösungen, Puffer und Medien .....	24
Tabelle 7: Übersicht Antikörper.....	26
Tabelle 8: Übersicht Zelllinien.....	27
Tabelle 9: Tiere .....	29
Tabelle 10: Immunisierungsschema der mTNFR2 <sup>-/-</sup> Mäuse. ....	34
Tabelle 11: Zusammensetzung eines SDS-Gels.....	42
Tabelle 12: Überblick über die im Western Blot eingesetzten Antikörper. ....	43
Tabelle 13: Tabelle der in der Durchflusszytometrie eingesetzten Antikörper .....	52
Tabelle 14: Übersicht über den prozentualen Anteil und die Absolutzahlen der im mTNFR2-IgG-ELISA als positiv gewerteten Zellklone.....	58

## 9 Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Viabilität im Zytotoxizitäts-Test .....	45
--	----

---

## 10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, ganz herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Daniela N. Männel, die mir dieses interessante Thema zur Verfügung gestellt hat und mir bei der Umsetzung stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herzlichsten Dank auch an Herrn Prof. Dr. Bernd Salzberger für das Interesse an meiner Arbeit und die Erstellung des Zweitgutachtens.

Ebenfalls möchte ich mich bei Johannes Polz für die engagierte Betreuung bedanken.

Außerdem geht ein großes Dankeschön an Dorothea Weber- Steffens für die grenzenlose Unterstützung in der Zellkultur und die vielen wertvollen Tipps und Tricks der Zellfusion. Die wissenschaftlichen und persönlichen Gespräche haben meine Arbeit im Labor sehr bereichert.

Ebenso danke ich Dr. Anja Wege, Dr. Sibylle Griebel und Dr. Lisa Martin für die Unterstützung am Durchflussszytometer und Dr. Uwe Richter für die Durchsicht dieser Arbeit.

Ferner möchte ich allen Mitarbeitern des Institutes der Immunologie danken, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Ein großer Dank gilt auch meinem Schatz für das offene Ohr, die Engelsgeduld und das grenzenlose Verständnis.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern dafür danken, dass sie mich während meiner Schulzeit, meinem Studium und meiner Promotion immer unterstützt haben. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen.



---

## 11 Curriculum Vitae

### Persönliche Daten:

Name, Vorname:	Minge, Diana Silvia
Geburtsdatum:	09.10.1985
Geburtsort:	Landshut
Familienstand:	ledig

### Ausbildung

Oktober 2005 - November 2011	Universität Regensburg- Studium der Humanmedizin
---------------------------------	--

September 1996 - Juni 2005	Gymnasium Seligenthal, Landshut
-------------------------------	---------------------------------

September 1992 - Juli 1996	Grundschule Ast, bei Landshut Grundschule Adlkofen, bei Landshut
-------------------------------	---

### Berufserfahrung

April 2011 - Juli 2011	Praktisches Jahr am Krankenhaus der Barmherzigen Brüder Regensburg Abteilung: Innere Medizin
---------------------------	--

Dezember 2010 - April 2010	Praktisches Jahr am Salem Spital Bern, Schweiz Abteilung: Chirurgie
-------------------------------	--

August 2010 - Dezember 2011	Praktisches Jahr am Kantonspital Aarau, Schweiz Abteilung: Neurologie
--------------------------------	--

---

Februar 2010	Famulatur im Krankenhaus der Barmherzigen Brüder Regensburg Abteilung: Neurologie
August 2009	Famulatur im Our's Lady's Hospital Dublin, Irland Abteilung: Pädiatrie
Februar 2009 - April 2009	Famulatur am Model Hospital Kathmandu, Nepal Abteilung: Pädiatrie
August 2008	Famulatur in der Praxis Dr. Zellner Landshut Fachrichtung: Gynäkologie
Februar 2008 - März 2008	Famulatur im Krankenhaus St. Hedwig Regensburg Abteilung: Gynäkologie
September 2006 - Oktober 2006	Pflegepraktikum im Krankenhaus St. Marien Landshut Abteilung: Pädiatrie
August 2006	Pflegepraktikum im Krankenhaus Landshut- Achdorf Abteilung: Notaufnahme
August 2005	Pflegepraktikum im Krankenhaus Landshut- Achdorf Abteilung: Notaufnahme